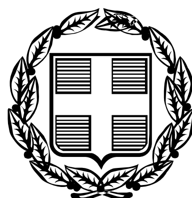


ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ

ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ

ΤΕΥΧΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ **Αρ. Φύλλου 562**

19 Απριλίου 2007

ΑΠΟΦΑΣΕΙΣ

Αριθμ. 117698

Τροποποίηση της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) απόφασης των υπουργών Εθνικής Οικονομίας και Γεωργίας «Μέτρα για την καταπολέμηση του παθογόνου των γεωμήλων Clavibacter michiganenesis spp. Sepedonicus (Spieckerman και Kotthoft) Davis et al σε συμμόρφωση προς την Οδηγία 93/85/ΕΚ του Συμβουλίου» σε συμμόρφωση προς την Οδηγία 2006/56/ΕΚ της Επιτροπής και συμπλήρωση των διατάξεων αυτής.

ΟΙ ΥΠΟΥΡΓΟΙ
ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΩΝ -
ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Έχοντας υπόψη

1. Τις διατάξεις:

α) του άρθρου μόνου του β.δ. 15/1956 (Α΄205) «Περί εξουσιοδοτήσεως του Υπουργού Γεωργίας προς έκδοσιν αποφάσεων συμφώνως των άρθρων 4 του υπ' αριθμ. 2147 νόμου του 1952»

β) του άρθρου 2 του π.δ. 411/1980 (Α΄ 112) «Περί ορισμού ασθενειών και εχθρών τινών των φυτών, ως υποχρεωτικώς καταπολεμητέων», όπως αυτό τροποποιήθηκε από το π.δ. 946/1981 (Α΄ 236)

γ) του άρθρου 1 παρ. 1, 2 και 3 του ν. 1338/1983 (Α΄ 34) «Εφαρμογή του Κοινοτικού Δικαίου», όπως η παρ. 1 τροποποιήθηκε από το άρθρο 6 παρ. 1 του ν. 1440/1984 (Α΄ 70) και του άρθρου 3 του ν. 1338/1983, όπως αυτό τροποποιήθηκε από το άρθρο 65 του ν. 1892/1990 (Α΄ 101)

δ) του άρθρου 90 του Κώδικα Νομοθεσίας για την Κυβέρνηση και τα Κυβερνητικά όργανα, όπως η νομοθεσία αυτή κωδικοποιήθηκε και τέθηκε σε ισχύ με το άρθρο πρώτο του π.δ. 63/2005 (Α΄ 98) «Κωδικοποίηση της νομοθεσίας για την Κυβέρνηση και τα Κυβερνητικά Όργανα».

2. Το ν. 2147/1952 (Α΄ 155) «Περί προλήψεως και καταστολής των ασθενειών και εχθρών των φυτών και περί οργανώσεως της Φυτοπαθολογικής Υπηρεσίας».

3. Την υπ' αριθμ. Υ 132/11.10.2004 (Β΄ 1533) απόφαση του Πρωθυπουργού και του Υπουργού Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων «Ανάθεση αρμοδιοτήτων στον Υφυπουργό Αγροτικής Ανάπτυξης Αλέξανδρο Κοντό».

4. Το γεγονός ότι από τις διατάξεις της παρούσας απόφασης δεν προκαλείται δαπάνη σε βάρος του κρατικού προϋπολογισμού, αποφασίζουμε:

Άρθρο 1
Σκοπός

Με την παρούσα απόφαση αντικαθίσταται το άρθρο 12 της αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) απόφασης των υπουργών Εθνικής Οικονομίας και Γεωργίας σε συμμόρφωση προς την Οδηγία 2006/56/ΕΚ (L 182/1, 4.7.2006) της Επιτροπής «για την τροποποίηση των παραρτημάτων της Οδηγίας 93/85/ΕΟΚ του Συμβουλίου για την καταπολέμηση της δακτυλιωτής σήψης (ring rot) της πατάτας» και προστίθεται άρθρο 13 στην ως άνω απόφαση.

Άρθρο 2
(Άρθρο 1 Οδηγία 2006/56/ΕΚ)

Το άρθρο 12 της υπ' αριθμ. 399882/1994 κοινής υπουργικής απόφασης αντικαθίσταται ως εξής:

«Άρθρο 12

Κατωτέρω παρατίθενται τα παραρτήματα I, II, III και IV που έχουν ως εξής:

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I
ΣΧΗΜΑ ΔΟΚΙΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ ΤΗΣ ΔΑΚΤΥΛΙΩΤΗΣ ΣΗΨΗΣ, CLAVIBACTER MICHIGANENSIS (Smith) Davis et al. ssp. SEPEDONICUS (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.

ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΔΟΚΙΜΩΝ

Το σχέδιο που παρουσιάζεται περιγράφει τις διάφορες διαδικασίες για:

i) τη διάγνωση της δακτυλιωτής σήψης σε κονδύλους και φυτά πατάτας,

ii) την ανίχνευση του Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus σε δείγματα κονδύλων και φυτών πατάτας,

iii) την ταυτοποίηση του Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus (C. m. subsp. sepedonicus).

ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

Στα προσαρτήματα παρέχονται βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα σχετικά με τις διάφορες μεθόδους, επικυρωμένα (validated) αντιδραστήρια και λεπτομέρειες

σχετικά με την προετοιμασία των υλικών δοκιμής και μαρτύρων. Στο προσάρτημα 1 παρατίθεται κατάλογος των εργαστηρίων που συμμετείχαν στη βελτιστοποίηση και επικύρωση των πρωτοκόλλων.

Λόγω του ότι τα πρωτόκολλα αφορούν την ανίχνευση ενός οργανισμού καραντίνας και περιλαμβάνουν τη χρήση βιώσιμων καλλιεργειών του C. m. subsp. sepedonicus (Cms) ως υλικών μαρτύρων, είναι απαραίτητο να εφαρμοσθούν οι διαδικασίες υπό τις κατάλληλες συνθήκες καραντίνας, με επαρκείς εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων και υπό την προϋπόθεση προηγούμενης χορήγησης των κατάλληλων αδειών από τις επίσημες αρχές που είναι υπεύθυνες για θέματα καραντίνας φυτών.

Οι παράμετροι που καθορίζουν τη διεξαγωγή των δοκιμών πρέπει να εξασφαλίζουν σταθερή και αναπαραγώγιμη ανίχνευση των επιπέδων του C. m. subsp. sepedonicus στα καθορισθέντα όρια των επιλεγμένων μεθόδων.

Η ακριβής παρασκευή των θετικών μαρτύρων είναι επιτακτική.

Η διενέργεια δοκιμών σύμφωνα με τα απαιτούμενα όρια προϋποθέτει επίσης την εξασφάλιση ορθών παραμέτρων, συντήρηση και βαθμονόμηση του εξοπλισμού, την προσεκτική μεταχείριση και συντήρηση των αντιδραστηρίων καθώς και τη λήψη όλων των απαραίτητων μέτρων για την αποφυγή μόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων, π.χ. το διαχωρισμό των θετικών μαρτύρων από τα ελεγχόμενα δείγματα. Είναι απαραίτητο να εφαρμόζονται πρότυπα ελέγχου της ποιότητας έτσι ώστε να αποφεύγονται διοικητικά και άλλα σφάλματα, ιδιαίτερα όσον αφορά τη σήμανση και την τεκμηρίωση.

Μία ύποπτη εμφάνιση του παθογόνου, όπως αυτή αναφέρεται στο άρθρο 4, Παράγραφος 2, της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης, σημαίνει την ύπαρξη θετικού αποτελέσματος των διαγνωστικών δοκιμών ή των δοκιμών διαλογής που διενεργήθηκαν επί δείγματος, όπως ορίζεται στα διαγράμματα ροής.

Εάν η πρώτη δοκιμή διαλογής (IF ή PCR/FISH) είναι θετική, τότε η μόλυνση από το Cms θεωρείται πιθανή και πρέπει να πραγματοποιηθεί δεύτερη δοκιμή διαλογής. Εάν και η δεύτερη δοκιμή διαλογής είναι θετική, τότε η υποψία μόλυνσης επιβεβαιώνεται (πιθανολογούμενη εμφάνιση του παθογόνου) και πρέπει να συνεχισθεί η πραγματοποίηση δοκιμών σύμφωνα με το σχήμα. Εάν η δεύτερη δοκιμή διαλογής είναι αρνητική, τότε θεωρείται ότι το δείγμα δεν έχει μολυνθεί από το Cms.

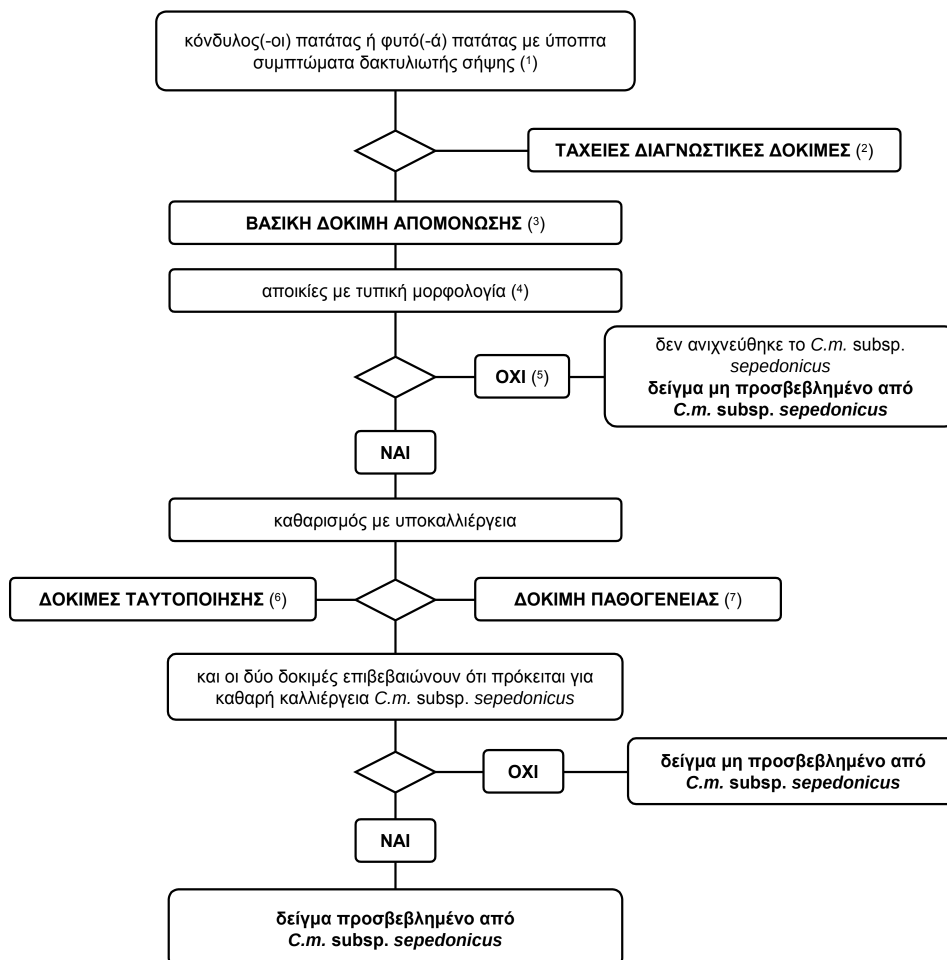
Για το λόγο αυτό, ως θετικό αποτέλεσμα της δοκιμής IF, όπως αναφέρεται στο άρθρο 4, παράγραφος 2, χαρακτηρίζεται η θετική ανάγνωση IF που έχει επιβεβαιωθεί από δεύτερη δοκιμή διαλογής (PCR/FISH).

Η επιβεβαίωση της παρουσίας του οργανισμού, όπως αναφέρεται στο άρθρο 5, παράγραφος 1 της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινή υπουργική απόφαση, σημαίνει την απομόνωση και ταυτοποίηση καθαρής καλλιέργειας του C. m. subsp. sepedonicus με επιβεβαίωση της παθογένειας.

1. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΡΟΗΣ

1.1. Σχήμα ανίχνευσης για τη διάγνωση της δακτυλιωτής σήψης σε κονδύλους πατάτας και φυτά πατάτας που παρουσιάζουν συμπτώματα δακτυλιωτής σήψης

Η διαδικασία εξέτασης προορίζεται για κονδύλους και φυτά πατάτας που παρουσιάζουν τυπικά ή ύποπτα συμπτώματα της δακτυλιωτής σήψης. Η διαδικασία περιλαμβάνει μία δοκιμή ταχείας διαλογής, απομόνωση του παθογόνου από προσβεβλημένο αγγειώδη ιστό σε διαγνωστικά υλικά και, σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, ταυτοποίηση της καλλιέργειας ως C. m. subsp. sepedonicus.



(1) Περιγραφή των συμπτωμάτων παρατίθεται στην ενότητα 2.
(2) Οι κατάλληλες δοκιμές είναι:
- δοκιμή IF (ενότητα 4)
- δοκιμή PCR (ενότητα 6)
- δοκιμή FISH (ενότητα 5).

(3) Αν και η απομόνωση του παθογόνου με τη διαδικασία διαδοχικών αραιώσεων επί στερεού υποστρώματος από φυτικό υλικό με τυπικά συμπτώματα είναι άμεση, η καλλιέργεια μπορεί να αποτύχει αν βρισκόμαστε σε προχωρημένα στάδια προσβολής. Σαπροφυτικά βακτήρια που αναπτύσσονται σε προσβεβλημένο ιστό μπορεί να επικαλύψουν ή να εμποδίσουν την ανάπτυξη του παθογόνου στο υλικό απομόνωσης. Για το λόγο αυτό, συνιστάται η χρήση τόσο μη εκλεκτικών όσο και εκλεκτικών υποστρωμάτων, κατά προτίμηση του MTNA (ενότητα 8) ή της βιοδοκιμής (ενότητα 7).

(4) Η περιγραφή της τυπικής μορφολογίας των αποικιών παρατίθεται στην ενότητα 8.

(5) Στην περίπτωση που το αποτέλεσμα της δοκιμής απομόνωσης είναι αρνητικό αλλά παρουσιάζονται τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας, πρέπει να επαναληφθεί η απομόνωση.

(6) Η αξιόπιστη ταυτοποίηση μιας καθαρής καλλιέργειας του C. m. subsp. sepedonicus επιτυγχάνεται με τη χρήση των δοκιμών που αναφέρονται στην ενότητα 9.

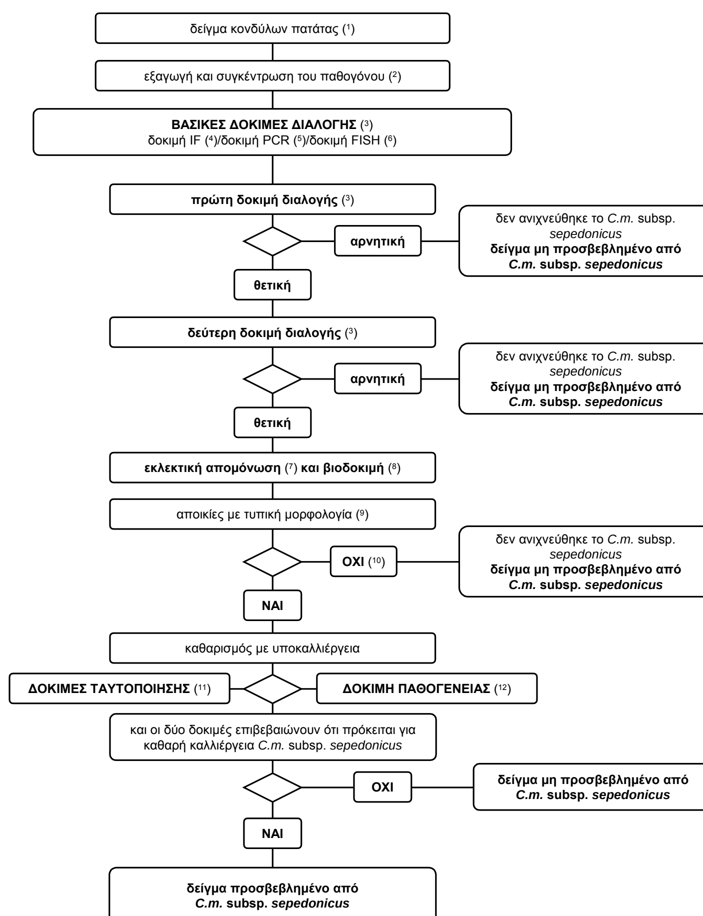
(7) Η δοκιμή παθογένειας περιγράφεται στην ενότητα 10.

1.2. Σχήμα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus σε δείγματα ασυμπτωματικών κονδύλων πατάτας

Αρχή

Η διαδικασία εξέτασης αποσκοπεί στην ανίχνευση λανθάνουσας μόλυνσης σε κονδύλους πατάτας. Το θετικό αποτέλεσμα τουλάχιστον δύο δοκιμών διαλογής που βασίζεται σε διαφορετικές βιολογικές αρχές, πρέπει να συμπληρώνεται με την απομόνωση του παθογόνου· ακολουθεί δε, στην περίπτωση απομόνωσης τυπικών αποικιών, επιβεβαίωση μιας καθαρής καλλιέργειας ως C. m. subsp. sepedonicus. Το θετικό αποτέλεσμα μίας μόνον δοκιμής διαλογής δεν επαρκεί για να θεωρηθεί το δείγμα ύποπτο.

Οι δοκιμές διαλογής και οι δοκιμές απομόνωσης πρέπει να επιτρέπουν όριο ανίχνευσης της τάξης των 103 έως 104 κυττάρων/ml αιωρήματος του ιζήματος, συμπεριλαμβανομένων ως θετικών μαρτύρων σε κάθε σειρά δοκιμών.



(1) Το πρότυπο μέγεθος δείγματος είναι 200 κόνδυλοι αν και η διαδικασία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί με μικρότερα δείγματα εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμοι 200 κόνδυλοι.

(2) Οι μέθοδοι εξαγωγής και συγκέντρωσης του παθογόνου περιγράφονται στην ενότητα 3.1.

(3) Στην περίπτωση που δύο τουλάχιστον δοκιμές με βάση διαφορετικές βιολογικές αρχές είναι θετικές, πρέπει να διεξαχθεί απομόνωση και επιβεβαίωση. Πραγματοποιείται τουλάχιστον μία δοκιμή διαλογής. Στην περίπτωση που η εν λόγω δοκιμή είναι αρνητική, το δείγμα θεωρείται αρνητικό. Στην περίπτωση που η εν λόγω δοκιμή είναι θετική, απαιτείται η διενέργεια δεύτερης ή περισσοτέρων δοκιμών διαλογής με βάση διαφορετικές βιολογικές αρχές έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί το πρώτο θετικό αποτέλεσμα. Εάν η δεύτερη ή οι άλλες δοκιμές είναι αρνητικές το δείγμα θεωρείται αρνητικό. Δεν είναι απαραίτητη η διενέργεια περαιτέρω δοκιμών.

(4) Δοκιμή ανοσοφθορισμού (IF).

Για τη δοκιμή διαλογής IF πρέπει να χρησιμοποιείται πάντοτε ένα πολυκλωνικό αντίσωμα. Η χρήση πρόσθετων μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι δυνατόν να παρέχει μεγαλύτερη εξειδίκευση (βλέπε ενότητα 4).

(5) Δοκιμή PCR.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται καταλλήλως επικυρωμένα αντιδραστήρια και πρωτόκολλα PCR (βλέπε ενότητα 6).

(6) Δοκιμή Fish.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται επικυρωμένα αντιδραστήρια και πρωτόκολλα (βλέπε ενότητα 5).

(7) Εκλεκτική απομόνωση.

Εάν χρησιμοποιείται το υπόστρωμα MTNA ή το υπόστρωμα NCP-88 και μία 1/100 αραίωση του αιωρήματος του ιζήματος, η μέθοδος αυτή ενδείκνυται σε πολλές περιπτώσεις για άμεση απομόνωση του C. m. subsp. sepedonicus. Οι τυπικές αποικίες είναι μπορούν να αποκτηθούν 3–10 ημέρες μετά την απομόνωση επί στερεού υποστρώματος.. Τότε το παθογόνο είναι δυνατόν να καθαρισθεί και να ταυτοποιηθεί. Για την πλήρη αξιοποίηση των δυνατοτήτων της δοκιμής, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η προσεκτική προετοιμασία των κώνων που λαμβάνονται από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου για την αποφυγή δευτερογενών βακτηρίων που έχουν σχέση με τον κόνδυλο της πατάτας που είναι ανταγωνιστές του C. m. subsp. sepedonicus στο θρεπτικό υπόστρωμα και μπορούν να καλύπτουν την ανάπτυξη του παθογόνου. Εάν αποτύχει η εν λόγω δοκιμή πρέπει να γίνει απομόνωση από φυτά που χρησιμοποιούνται για τη βιοδοκιμή (βλέπε ενότητα 8).

(8) Η βιοδοκιμή χρησιμοποιείται για την απομόνωση του C. m. subsp. sepedonicus από ιζήματα εκχυλισμάτων πατάτας κατόπιν εκλεκτικού εμπλουτισμού σε φυτά μελιτζάνας (Solanum melongena). Η δοκιμή απαιτεί άριστες συνθήκες επώασης όπως εξειδικεύονται στη μέθοδο αυτή. Τυχόν βακτήρια που δρουν παρεμποδιστικά έναντι του C. m. subsp. sepedonicus στο υπόστρωμα MTNA ή NCP-88, κατά πάσα πιθανότητα, δεν δρουν παρεμβατικά στη δοκιμή αυτή (βλέπε ενότητα 7).

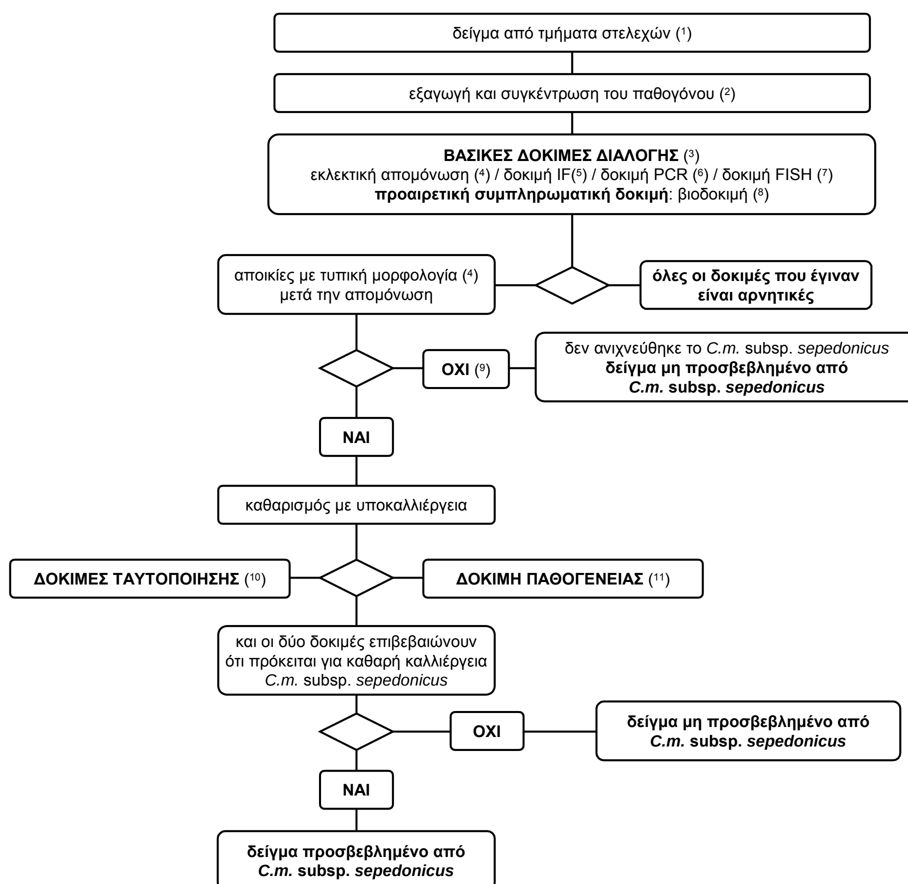
(9) Η τυπική μορφολογία των αποικιών περιγράφεται στην ενότητα 8.

(10) Η καλλιέργεια ή οι βιοδοκιμές είναι δυνατόν να αποτύχουν λόγω ανταγωνισμού ή παρεμπόδισης από σαπροφυτικά βακτήρια. Εάν αποκτηθούν θετικά αποτελέσματα στις δοκιμές διαλογής, αλλά τα αποτελέσματα των δοκιμών απομόνωσης είναι αρνητικά, πρέπει να επαναληφθούν οι δοκιμές απομόνωσης από το ίδιο ίζημα ή με τη λήψη πρόσθετου αγγειώδους ιστού κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου από κομμένους κονδύλους του ίδιου δείγματος και, εάν είναι απαραίτητο, να ελεγχθούν πρόσθετα δείγματα.

(11) Η αξιόπιστη ταυτοποίηση καθαρής πιθανής καλλιέργειας του C. m. subsp. sepedonicus επιτυγχάνεται με τη χρήση των δοκιμών που αναφέρονται στην ενότητα 9.

(12) Η δοκιμή παθογένειας περιγράφεται στην ενότητα 10

1.3. Σχήμα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus σε δείγματα ασυμπτωματικών φυτών πατάτας



(1) Βλέπε ενότητα 3.2 για τα συνιστώμενα μεγέθη δειγμάτων.

(2) Οι μέθοδοι εξαγωγής και συγκέντρωσης του παθογόνου περιγράφονται στην ενότητα 3.2.

(3) Στην περίπτωση που δύο τουλάχιστον δοκιμές με βάση διαφορετικές βιολογικές αρχές είναι θετικές, πρέπει να διεξαχθεί απομόνωση και επιβεβαίωση.

Πρέπει να πραγματοποιηθεί τουλάχιστον μια δοκιμή διαλογής. Εάν το αποτέλεσμα της δοκιμής αυτής είναι αρνητικό, το δείγμα θεωρείται αρνητικό. Εάν το αποτέλεσμα της εν λόγω δοκιμής είναι θετικό, απαιτείται η διενέργεια δεύτερης ή περισσοτέρων δοκιμών διαλογής με βάση διαφορετικές βιολογικές αρχές έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί το αρχικό θετικό αποτέλεσμα. Εάν η δεύτερη ή άλλες δοκιμές είναι αρνητικές, το δείγμα θεωρείται αρνητικό. Δεν είναι απαραίτητες περαιτέρω δοκιμές.

(4) Η δοκιμή εκλεκτικής απομόνωσης και η τυπική μορφολογία αποικίας περιγράφονται στην ενότητα 8.

(5) Η δοκιμή IF περιγράφεται στην ενότητα 4.

(6) Οι δοκιμές PCR περιγράφονται στην ενότητα 6.

(7) Η δοκιμή FISH περιγράφεται στην ενότητα 5.

(8) Η βιοδοκιμή περιγράφεται στην ενότητα 7.

(9) Η καλλιέργεια ή οι βιοδοκιμές είναι δυνατόν να αποτύχουν λόγω ανταγωνισμού ή παρεμπόδισης από σαπροφυτικά βακτήρια. Εάν αποκτηθούν θετικά αποτελέσματα στις δοκιμές διαλογής αλλά τα αποτελέσματα των δοκιμών απομόνωσης είναι αρνητικά, πρέπει να επαναληφθούν οι δοκιμές απομόνωσης και, εάν είναι απαραίτητο, να ελεγχθούν πρόσθετα δείγματα.

(10) Η αξιόπιστη ταυτοποίηση καθαρών πιθανών καλλιεργειών του C. m. subsp. sepedonicus επιτυγχάνεται με τη χρήση των δοκιμών που αναφέρονται στην ενότητα 9.

(11) Η δοκιμή παθογένειας περιγράφεται στην ενότητα 10.

2. Μακροσκοπική εξέταση για συμπτώματα ΔΑΚΤΥΛΙΩΤΗΣ ΣΗΨΗΣ

2.1. Φυτά πατάτας

Στις ευρωπαϊκές κλιματολογικές συνθήκες, τα συμπτώματα σπανίως εντοπίζονται στον αγρό και συχνά μόνον στο τέλος εποχής. Επιπροσθέτως, τα συμπτώματα είναι συχνά κεκαλυμμένα ή συγχέονται με άλλες ασθένειες, το γήρας ή μηχανικές βλάβες. Ως εκ τούτου, είναι εύκολο τα συμπτώματα να διαφύγουν της προσοχής κατά τις επιθεωρήσεις του αγρού. Τα συμπτώματα μάρανσης είναι πολύ διαφορετικά από αυτά της καστανής σήψης (brown rot)· πρόκειται συνήθως για βραδεία μάρανση, η οποία αρχικά είναι περιορισμένη στην περίμετρο των φύλλων. Τα νεαρά προσβεβλημένα φύλλα συχνά συνεχίζουν να μεγαλώνουν αν και αυτό συμβαίνει σε μικρότερη κλίμακα στις προσβεβλημένες ζώνες. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία φύλλων με περίεργο σχήμα. Στα φύλλα που έχουν επηρεαστεί από την έμφραξη του αγγειώδους ιστού σε χαμηλότερο τμήμα του στελέχους συχνά αναπτύσσονται χλωρωτικές, κίτρινες προς πορτοκαλί, εσωπλευρικές περιοχές. Τα προσβεβλημένα φυλλίδια, φύλλα καθώς και τα στελέχη ακόμη ενδέχεται τελικά να νεκρωθούν. Συχνά τα φύλλα και οι κόνδυλοι έχουν απλά μειωμένο μέγεθος. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται νανισμός των φυτών.

Στον ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main υπάρχουν έγχρωμες φωτογραφίες ενός εύρους συμπτωμάτων.

2.2. Κόνδυλοι πατάτας

Τα αρχικά συμπτώματα είναι μία ελαφρά υαλώδης εμφάνιση ή διαφάνεια του ιστού, χωρίς μαλάκωμα των ιστών γύρω από το αγγειώδες σύστημα, ιδιαίτερα κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου. Ο δακτύλιος των αγγείων κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου ενδέχεται να είναι ελαφρώς σκουρότερος απ' ότι συνήθως. Το πρώτο εύκολα αναγνωρίσιμο σύμπτωμα είναι αυτό που ο αγγειώδης δακτύλιος εμφανίζει υποκίτρινο χρωματισμό και με ελαφρά συμπίεση του κονδύλου εξέρχεται τυρώδες εξίδρωμα από τα αγγεία. Το εξίδρωμα αυτό περιέχει εκατομμύρια βακτηρίων. Ενίοτε εμφανίζεται και καστανόχρωμος χρωματισμός του αγγειώδους ιστού και τα συμπτώματα των κονδύλων στο στάδιο αυτό είναι όμοια με αυτά της καστανής σήψης που προκαλείται από το Ralstonia solanacearum. Αρχικά, τα συμπτώματα αυτά μπορεί να είναι περιορισμένα σε ένα μόνον τμήμα του δακτυλίου, όχι απαραίτητα κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου και μπορεί προοδευτικά να επεκταθούν σ' ολόκληρο το δακτύλιο. Με την επέκταση της προσβολής παρατηρείται καταστροφή του αγγειώδους ιστού· ενδέχεται δε να παρατηρηθεί και αποκόλληση του εξωτερικού φλοιού από τον εσωτερικό. Σε προχωρημένα στάδια της προσβολής, εμφανίζονται στην επιφάνεια του κονδύλου ρωγμές, των οποίων τα όρια είναι συχνά καστανοκόκκινα. Πρόσφατα υπήρξαν στην Ευρώπη αρκετές περιπτώσεις που η σήψη του κεντρικού φλοιού λαμβάνει χώρα παράλληλα με αυτήν του αγγειώδους δακτυλίου και έχει ως αποτέλεσμα δευτερογενή μόλυνση με δημιουργία εσωτερικών κοιλοτήτων και νέκρωση. Οι δευτερογενείς μολύνσεις από μύκητες ή βακτήρια καλύπτουν ενίοτε τα συμπτώματα αυτά και συχνά είναι δύσκολο, αν όχι αδύνατο, να διακριθούν τα προχωρημένου σταδίου συμπτώματα της δακτυλιωτής σήψης από άλλες σήψεις των κονδύλων. Ενδέχεται να υπάρχουν επίσης άτυπα συμπτώματα.

Στον ιστοχώρο : http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main υπάρχουν έγχρωμες φωτογραφίες ενός εύρους συμπτωμάτων.

3. Προετοιμασία του δείγματος

3.1. Κόνδυλοι πατάτας

Σημείωση:

- Το πρότυπο μέγεθος δείγματος είναι 200 κόνδυλοι ανά δοκιμή. Πιο εντατική δειγματοληψία απαιτεί περισσότερες δοκιμές σε δείγματα του μεγέθους αυτού. Μεγαλύτερος αριθμός κονδύλων στο δείγμα θα έχει ως αποτέλεσμα παρεμπόδιση ή δυσκολίες στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η διαδικασία όμως μπορεί να εφαρμοσθεί και για δείγματα μικρότερα των 200 κονδύλων στην περίπτωση που είναι λιγότεροι οι διαθέσιμοι κόνδυλοι.
- Η επικύρωση όλων των μεθόδων ανίχνευσης που περιγράφονται στη συνέχεια βασίζεται στη διενέργεια δοκιμών σε δείγματα 200 κονδύλων.
- Το εκχύλισμα πατάτας που περιγράφεται παρακάτω μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του βακτηρίου της καστανής σήψης, Ralstonia solanacearum

Προαιρετική προεπεξεργασία πριν από την προετοιμασία του δείγματος:

Πλένονται οι κόνδυλοι. Χρησιμοποιούνται κατάλληλα απολυμαντικά (χλωριούχες ενώσεις εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί η δοκιμή PCR με στόχο την απομάκρυνση τυχόν DNA του παθογόνου) και απορρυπαντικά μετά από κάθε δείγμα. Οι κόνδυλοι στεγνώνονται στον αέρα. Η ανωτέρω διαδικασία πλύσης είναι ιδιαίτερα χρήσιμη (αλλά δεν απαιτείται) για δείγματα με περίσσεια εδάφους και στην περίπτωση που θα εφαρμοσθεί η δοκιμή PCR ή η διαδικασία άμεσης απομόνωσης.

3.1.1. Με ένα καθαρό και απολυμασμένο νυστέρι ή μαχαίρι λαχανικών, αφαιρείται η επιδερμίδα γύρω από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου του κονδύλου έτσι ώστε να φανούν οι αγγειώδεις ιστοί. Αποκόπτουμε με προσοχή ένα μικρό κώνο αγγειώδους ιστού από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου και προσέχουμε ώστε η αφαιρούμενη ποσότητα μη αγγειώδους ιστού να είναι η ελάχιστη δυνατή (βλέπε ιστοχώρο: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

Σημείωση:

Κάθε κόνδυλος με ύποπτα συμπτώματα δακτυλιωτής σήψης αφήνεται παράμερα και εξετάζεται χωριστά.

Εάν κατά τη διάρκεια της αφαίρεσης του κώνου από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου παρατηρηθούν ύποπτα συμπτώματα δακτυλιωτής σήψης, θα πρέπει να διενεργηθεί μακροσκοπική επιθεώρηση του κονδύλου με κοπή του κοντά στο σημείο πρόσφυσης του στολονίου. Όλοι οι κομμένοι κόνδυλοι με ύποπτα συμπτώματα πρέπει να φελλοποιούνται για 2 τουλάχιστον ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου και να φυλάσσονται σε συνθήκες απομόνωσης (σε 4 - 10 °C) έως ότου ολοκληρωθούν όλες οι δοκιμές. Όλοι οι κόνδυλοι του δείγματος (συμπεριλαμβανομένων εκείνων που παρουσιάζουν ύποπτα συμπτώματα) πρέπει να διατηρούνται σύμφωνα με το παράρτημα II.

3.1.2. Οι κώνοι που έχουν ληφθεί από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου συλλέγονται σε μη χρησιμοποιηθέντες περιέκτες μιας χρήσης, οι οποίοι είναι δυνατόν να είναι κλεισμένοι και/ή σφραγισμένοι (στην περίπτωση

που οι περιέκτες έχουν ξαναχρησιμοποιηθεί θα πρέπει να καθαρισθούν επιμελώς και να απολυμανθούν με χλωριούχες ενώσεις). Είναι προτιμότερο οι κώνοι από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου να υποβάλλονται σε κατεργασία αμέσως. Εάν αυτό δεν είναι δυνατόν, αποθηκεύονται στον περιέκτη, χωρίς την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος, στο ψυγείο μέχρι 72 ώρες ή σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι 24 ώρες. Το στέγνωμα και η φελλοποίηση των κώνων καθώς και η ανάπτυξη των σαπρόφυτων κατά την αποθήκευση ενδέχεται να παρεμποδίσουν την ανίχνευση του βακτηρίου της δακτυλιωτής σήψης.

3.1.3. Οι κώνοι από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου υποβάλλονται σε κατεργασία με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες: είτε

α) οι κώνοι καλύπτονται με επαρκή όγκο (περίπου 40 ml) ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (Προσάρτημα 3) και αναταράσσονται σε περιστροφικό αναδευτήρα (50-100 rpm) για 4 ώρες σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 24°C ή για 16-24 ώρες στο ψυγείο,

ή

β) οι κώνοι ομοιογενοποιούνται με επαρκή όγκο (περίπου 40 ml) ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (Προσάρτημα 3), είτε σε αναμείκτη (π.χ. Waring ή Ultra Thurax) είτε με σύνθλιψη σε σφραγισμένο σάκο διαβροχής μίας χρήσης (π.χ. Stomacher ή Bioreba strong guage polythene, 150 mm x 250 mm· αποστειρωμένα διά ακτινοβολίας) χρησιμοποιώντας λαστιχένια ματσόλα ή τον κατάλληλο εξοπλισμό σύνθλιψης(π.χ. Homex).

Σημείωση:

Ο κίνδυνος επιμόλυνσης των δειγμάτων είναι υψηλός όταν τα δείγματα ομοιογενοποιούνται με τη χρήση αναμείκτη. Πρέπει να ληφθούν προφυλάξεις για την αποφυγή της δημιουργίας αερολύματος ή υπερχείλισης κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εξαγωγής. Πρέπει να διασφαλισθεί ότι χρησιμοποιούνται για κάθε δείγμα λεπίδες και δοχεία του αναμείκτη πρόσφατα αποστειρωμένα. Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί η δοκιμή PCR, πρέπει να αποφευχθεί η μεταφορά DNA στους περιέκτες ή τον εξοπλισμό σύνθλιψης. Στις περιπτώσεις που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί η PCR, συνιστάται η σύνθλιψη σε σάκους μιας χρήσης καθώς και η χρήση σωλήνων μιας χρήσης.

3.1.4. Το υπερκείμενο υγρό μεταγγίζεται. Εφόσον το υγρό εμφανίζεται θολό, καθίσταται διαυγές είτε με φυγοκέντριση σε χαμηλή ταχύτητα (όχι περισσότερο από 180 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4-10΄ΙC) είτε με διήθηση (40-100 μm), με αντλία κενού πλένοντας το φίλτρο με πρόσθετο (10 ml) ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής (Προσάρτημα 3).

3.1.5. Το βακτηριακό κλάσμα συγκεντρώνεται με φυγοκέντριση σε 7.000 g για 15 λεπτά (ή 10.000 g για 10 λεπτά) σε θερμοκρασία 4-10΄ΙC και το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα.

3.1.6. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 1,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος του ιζήματος (προσάρτημα 3). Χρησιμοποιούνται 500 μl για τον έλεγχο του C. m. subsp. sepedonicus, 500 μl για το Ralstonia solanacearum και 500 μl για σκοπούς αναφοράς. Προστίθεται αποστειρωμένη γλυκερίνη σε τελική συγκέντρωση 10-25% (v/v) στα 500 μl της ποσότητας αναφοράς και στην εναπομείνασα ποσότητα δοκιμής, ανακατεύουμε με στροβιλισμό (vortex) και αποθηκεύουμε σε θερμοκρασία -16 έως -24°C (εβδομάδες) ή στους -68 έως -86° C (μήνες). Οι ποσότητες δοκιμών διατηρούνται σε θερμοκρασία 4-10°C κατά τη διεξαγωγή των δοκιμών.

Δεν συνιστάται η επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη.

Εάν απαιτείται η μεταφορά του εκχυλίσματος, πρέπει να εξασφαλισθεί ότι η διανομή θα πραγματοποιηθεί σε ψυκτικό δοχείο εντός 24 έως 48 ωρών.

3.1.7. Είναι επιτακτικό, όπως όλοι οι θετικοί μάρτυρες του C. m. subsp. sepedonicus και τα δείγματα χειρίζονται χωριστά ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση. Το ίδιο ισχύει και για τις αντικειμενοφόρους της δοκιμής IF και για όλες τις δοκιμές.

3.2. Φυτά πατάτας

Σημείωση:

Για την ανίχνευση των λανθανόντων πληθυσμών του C. m. subsp. sepedonicus συνιστάται ο έλεγχος σύνθετων δειγμάτων. Η διαδικασία είναι δυνατόν να εφαρμοσθεί κατάλληλα και για σύνθετα δείγματα με έως 200 τμήματα στελεχών. (Εάν πραγματοποιούνται επισκοπήσεις (surveys), αυτές πρέπει να βασίζονται σε στατιστικά αντιπροσωπευτικό δείγμα του πληθυσμού φυτών υπό εξέταση.)

3.2.1. Με ένα καθαρό και απολυμασμένο μαχαίρι ή κλαδευτική ψαλίδα, αφαιρείται τμήμα 1-2 cm από τη βάση κάθε στελέχους, πάνω ακριβώς από το έδαφος.

Τα τμήματα στελεχών απολυμαίνονται για σύντομο χρονικό διάστημα με αιθανόλη 70 % και στεγνώνεται αμέσως με απορροφητικό χαρτί.

Τα τμήματα στελεχών συλλέγονται σε κλειστό αποστειρωμένο περιέκτη.

3.2.2. Τα τμήματα στελεχών υποβάλλονται σε κατεργασία με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες: είτε,

α) τα τμήματα καλύπτονται με επαρκή όγκο (περίπου 40 ml) ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (Προσάρτημα 3) και αναταράσσονται σε περιστροφικό αναδευτήρα (50-100 rpm) για 4 ώρες σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 24 °C ή για 16-24 ώρες στο ψυγείο,

ή

β) υποβάλλονται σε κατεργασία αμέσως, με σύνθλιψη των τμημάτων εντός ανθεκτικού σάκκου διαβροχής (π.χ. Stomacher ή Bioreba) με τον κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής (Προσάρτημα 3) χρησιμοποιώντας λαστιχένια ματσόλα ή τον κατάλληλο εξοπλισμό σύνθλιψης (π.χ. Homex). Στην περίπτωση που αυτό δεν είναι δυνατόν, τα τμήματα στελέχους αποθηκεύονται στο ψυγείο για χρονικό διάστημα 72 ωρών το μέγιστο ή σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα 24 ωρών το μέγιστο.

3.2.3. Το υπερκείμενο υγρό μεταγγίζεται αφού κατακαθίσει για 15 λεπτά.

3.2.4. Περαιτέρω διαύγαση του εκχυλίσματος ή συγκέντρωση του βακτηριακού κλάσματος δεν απαιτούνται συνήθως αλλά μπορούν να επιτευχθούν με διήθηση και/ή φυγοκέντριση όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.1.4. μέχρι 3.1.6.

3.2.5. Το αδιάλυτο ή συγκεντρωμένο εκχύλισμα δείγματος χωρίζεται σε 2 ίσα μέρη. Το ήμισυ διατηρείται σε 4-10΄ΙC κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής και το άλλο μισό φυλάσσεται με 10-25% (v/v) αποστειρωμένη γλυκερίνη σε θερμοκρασία -16 έως -24 °C (εβδομάδες) ή σε θερμοκρασία -68 έως -86 °C (μήνες) για την περίπτωση που χρειασθεί η διενέργεια περαιτέρω δοκιμών.

4. Δοκιμή IF

Αρχή

Η χρήση της δοκιμής IF ως αρχικής δοκιμής διαλογής συνιστάται λόγω της αποδεδειγμένης ευρωστίας της για την επίτευξη των απαιτούμενων ορίων.

Όταν η δοκιμή IF χρησιμοποιείται ως αρχική δοκιμή διαλογής και η ανάγνωση IF είναι θετική, πρέπει να πραγματοποιηθεί η δοκιμή PCR ή FISH ως δεύτερη δοκιμή διαλογής. Όταν η δοκιμή IF χρησιμοποιείται ως δεύτερη δοκιμή διαλογής και η ανάγνωση IF είναι θετική, απαιτείται διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών σύμφωνα με το διάγραμμα ροής για την ολοκλήρωση της ανάλυσης.

Σημείωση:

Όταν η δοκιμή IF χρησιμοποιείται ως αρχική δοκιμή διαλογής, χρησιμοποιείται πάντοτε ένα πολυκλωνικό αντίσωμα. Σε περίπτωση θετικής ανάγνωσης IF με πολυκλωνικό αντίσωμα, η περαιτέρω διαλογή του δείγματος με μονοκλωνικό αντίσωμα είναι δυνατόν να παράσχει μεγαλύτερη εξειδίκευση αλλά μπορεί να είναι λιγότερο ευαίσθητη.

Χρησιμοποιούνται αντισώματα σε στέλεχος αναφοράς του C. m. subsp. sepedonicus. Συνιστάται ο προσδιορισμός του τίτλου για κάθε νέα παρτίδα αντισωμάτων. Ως τίτλος ορίζεται η μεγαλύτερη αραίωση στην οποία λαμβάνει χώρα η βέλτιστη αντίδραση όταν υποβάλλεται σε δοκιμή αιώρημα που περιέχει 105 έως 106 κύτταρα ανά ml του ομόλογου στελέχους του C. m. subsp. sepedonicus και χρησιμοποιείται κατάλληλο σύμπλοκο ισοθειοκυανικής φθορεϊσίνης (FITC) σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Τα πρωτογενή πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα πρέπει να έχουν τίτλο IF τουλάχιστον 1:2000. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, τα αντισώματα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε αραίωση(-εις) εργασίας (WD) στον τίτλο ή κοντά στον τίτλο. Χρησιμοποιούνται επικυρωμένα αντισώματα (βλέπε ιστοχώρο: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main.)

Η δοκιμή πρέπει να πραγματοποιείται σε εκχυλίσματα δειγμάτων που έχουν μόλις παρασκευασθεί. Εάν είναι απαραίτητο, μπορεί να πραγματοποιηθεί με επιτυχία σε εκχυλίσματα που έχουν αποθηκευθεί σε θερμοκρασία -68 έως -86 °C σε γλυκερίνη. Η γλυκερίνη είναι δυνατόν να αφαιρεθεί από το δείγμα με την προσθήκη 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιζήματος (Προσάρτημα 4), εκ νέου φυγοκέντριση για 15 λεπτά σε 7000 g και επανασχηματισμό αιωρήματος σε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ιζήματος. Συχνά αυτό δεν είναι αναγκαίο, ιδιαίτερα εάν τα δείγματα αντικειμενοφόρου έχουν προσηλωθεί στις αντικειμενοφόρους με διέλευση από φλόγα (βλέπε 2.2).

Παρασκευάζονται ως θετικοί μάρτυρες ξεχωριστοί αντικειμενοφόροι από ομόλογο στέλεχος ή άλλο στέλεχος αναφοράς του C. m. subsp. sepedonicus, που είναι αιώρημα σε εκχύλισμα πατάτας, όπως περιγράφεται στο Προσάρτημα 2, και προαιρετικά σε ρυθμιστικό διάλυμα.

Ως παρόμοιοι μάρτυρες πρέπει να χρησιμοποιούνται, όποτε είναι δυνατόν, στην ίδια αντικειμενοφόρο, φυσικώς μολυσμένοι ιστοί (που διατηρούνται με λυοφιλίωση ή κατάψυξη στους -16 έως -24°C).

Ως αρνητικοί μάρτυρες, χρησιμοποιούνται κατάλληλες ποσότητες εκχυλίσματος δείγματος που προηγουμένως είχε δοκιμαστεί και ήταν αρνητικό.

Χρησιμοποιούνται πολυφατνιακές αντικειμενοφόροι πλάκες μικροσκοπίου με 10 κατά προτίμηση φατνία διαμέτρου τουλάχιστον 6 mm.

Η δοκιμή του υλικού των μαρτύρων γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως αυτή του ή των δειγμάτων.

4.1. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες δοκιμής προετοιμάζονται με μία από τις ακόλουθες διαδικασίες:

i) Για ιζήματα με μικρή σχετικά ποσότητα ιζήματος αμύλου:

Στο πρώτο φατνίο, φέρεται μετρημένος με σιφώνιο συγκεκριμένος όγκος (15 μl είναι αρκετός για φατνία με διάμετρο 6 mm - ο όγκος κλιμακώνεται προς τα άνω για μεγαλύτερα φατνία) αραίωσης 1/100 του αιωρήματος του ιζήματος πατάτας. Στη συνέχεια, φέρεται με σιφώνιο όμοιος όγκος μη αραιωμένου ιζήματος (1/1) στα υπόλοιπα φατνία διαδοχικά. Η δεύτερη σειρά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείγμα εις διπλούν ή ως δεύτερο δείγμα όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.

ii) Για άλλα ιζήματα:

Παρασκευάζονται δεκαδικές αραιώσεις (1/10 και 1/100) του αιωρήματος του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος. Σε μία σειρά φατνίων, φέρεται μετρημένος με σιφώνιο συγκεκριμένος όγκος (15 μl είναι αρκετός για φατνία με διάμετρο 6 mm - ο όγκος κλιμακώνεται προς τα άνω για μεγαλύτερα φατνία) του αιωρήματος του ιζήματος και κάθε αραίωση. Η δεύτερη σειρά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επανάληψη του πρώτου δείγματος ή για ένα δεύτερο δείγμα όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.

4.2. Τα σταγονίδια στεγνώνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή με θέρμανση σε θερμοκρασίες 40 έως 45 °C. Τα βακτηριακά κύτταρα προσηλώνονται στην αντικειμενοφόρο με θέρμανση (15 λεπτά στους 60 °C), με φλόγα, με 95 % αιθανόλη ή σύμφωνα με τις συγκεκριμένες οδηγίες των προμηθευτών των αντισωμάτων.

Εάν είναι απαραίτητο, οι προσηλωμένες αντικειμενοφόροι είναι δυνατόν να φυλαχθούν στη συνέχεια στην κατάψυξη σε αφυδατωμένο δοχείο για όσο το δυνατόν μικρότερο χρονικό διάστημα (το μέγιστο για 3 μήνες) προτού υποβληθούν σε περαιτέρω δοκιμές.

4.3. Διαδικασία IF:

i) Σύμφωνα με την προετοιμασία της αντικειμενοφόρου δοκιμής στο σημείο 4.1.i):

Παρασκευάζεται μία σειρά αραιώσεων του αντισώματος στο διπλάσιο σε ρυθμιστικό διάλυμα για IF. Το πρώτο φατνίο πρέπει να έχει 1/2 του τίτλου (T/2), τα υπόλοιπα 1/4 του τίτλου (T/4), 1/2 του τίτλου (T/2), τον τίτλο (T) και το διπλάσιο του τίτλου (2T).

ii) Σύμφωνα με την ετοιμασία της αντικειμενοφόρου προς δοκιμή στο σημείο 4.1.ii):

Παρασκευάζεται η αραίωση εργασίας (WD) του αντισώματος σε ρυθμιστικό διάλυμα για IF. Η αραίωση εργασίας επηρεάζει την εξειδίκευση.

Εικόνα 1. Προετοιμασία της αντικειμενοφόρου πλάκας δοκιμής σύμφωνα με τα σημεία 4.1.i) και 4.3.i)

Αραιώσεις του αναδιαλυμένου ιζήματος

	1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	Αραίωση του αναδιαλυμένου ιζήματος
(Τ = τίτλος)	Τ/2	Τ/4	Τ/2	Τ	2Τ	Αραιώσεις του αντιορρού/αντισώ-ματος στο διπλάσιο
Δείγμα 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Αντίγραφο του δείγματος 1 ή του δείγματος 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Εικόνα 2. Προετοιμασία της αντικειμενοφόρου πλάκας δοκιμής σύμφωνα με τα σημεία 4.1.ii) και 4.3.ii)

Αραίωση εργασίας του αντιορρού/αντισώματος

	1/1	1/10	1/100	κενό	κενό	Δεκαδική αραίωση του αναδιαλυμένου ιζήματος
Δείγμα 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Επανάληψη του δείγματος 1 ή δείγμα 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

4.3.1. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες διευθετούνται πάνω σε υγρό χαρτί. Κάθε φατνίο δοκιμής καλύπτεται πλήρως με την ή τις αραιώσεις του αντισώματος. Ο όγκος του αντισώματος που εφαρμόζεται σε κάθε φατνίο πρέπει να είναι τουλάχιστον ίσος με τον όγκο του εφαρμοσθέντος εκχυλίσματος.

Η ακόλουθη διαδικασία πρέπει να εφαρμόζεται στην περίπτωση που δεν υπάρχουν συγκεκριμένες οδηγίες από τους προμηθευτές των αντισωμάτων:

4.3.2. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες επωάζονται σε υγρό χαρτί κάτω από ένα κάλυμμα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-25°C).

4.3.3. Τα σταγονίδια απομακρύνονται με ένα ελαφρό τίναγμα από την αντικειμενοφόρο και ακολουθεί προσεκτικό ξέπλυμα με ρυθμιστικό διάλυμα IF. Πλένονται με βύθισμα για 5 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα IF-Tween (Προσάρτημα 3) και στη συνέχεια για 5 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα IF. Πρέπει να αποφεύγεται η δημιουργία αερολυμάτων ή η μεταφορά σταγονιδίων που θα μπορούσαν να έχουν ως αποτέλεσμα την επιμόλυνση. Η περίσσεια νερού αφαιρείται προσεκτικά χρησιμοποιώντας με απαλές κινήσεις ένα στυπόχαρτο.

4.3.4. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες διευθετούνται πάνω σε υγρό χαρτί. Τα φατνία δοκιμής καλύπτονται με την αραίωση του συμπλόκου FITC που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του τίτλου. Ο όγκος του χρησιμοποιούμενου στα φατνία συμπλόκου πρέπει να είναι ίδιος με τον όγκο του εφαρμοσθέντος αντισώματος.

4.3.5. Οι αντικειμενοφόροι επωάζονται σε υγρό χαρτί κάτω από ένα κάλυμμα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-25 °C).

4.3.6. Τα σταγονίδια του συμπλόκου απομακρύνονται με ελαφρό τίναγμα από την αντικειμενοφόρο. Οι αντικειμενοφόροι ξεπλένονται και πλένονται όπως προηγουμένως (4.3.3).

Η περίσσεια υγρασίας αφαιρείται προσεκτικά.

4.3.7. Σε κάθε φατνίο φέρονται με σιφώνιο 5-10 μl 0,1M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος γλυκερίνης (Προσάρτημα 3) ή εμπορικού αντιξεθωριαστικού υλικού έγκλεισης και τα φατνία καλύπτονται με μία καλυπτρίδα.

4.4. Ανάγνωση της δοκιμής IF:

4.4.1. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες δοκιμής εξετάζονται σε μικροσκόπιο επιφθορισμού με φίλτρα κατάλληλα για τη διέγερση του FITC, με ελαιο- ή υδατοκαταδυτικό φακό σε μεγέθυνση 500-1000 x. Τα φατνία εξετάζονται κατά δύο κάθετες διαμέτρους και κατά την περίμετρό τους. Όσον αφορά τα δείγματα που δεν δείχνουν καθόλου κύτταρα ή δείχνουν μικρό αριθμό κυττάρων, πρέπει να παρατηρηθούν τουλάχιστον 40 πεδία μικροσκοπίου.

Πρώτα ελέγχεται η αντικειμενοφόρος του θετικού μάρτυρα. Τα κύτταρα πρέπει να είναι πλήρως χρωσμένα με λαμπρό φθορισμό στον προσδιορισμένο τίτλο

αντισώματος ή την αραίωση εργασίας. Σε περίπτωση παρέκκλισης της χρώσης, η δοκιμή IF (ενότητα 4) επαναλαμβάνεται.

4.4.2. Εξετάζεται εάν υπάρχουν λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με τη χαρακτηριστική μορφολογία του C. m. subsp. sepedonicus στα φατνία δοκιμής των αντικειμενοφόρων πλακών δοκιμής (βλέπε ιστοχώρο: http:forum.europa.eu.int/

Public/irc/sanco/Home/main). Η ένταση του φθορισμού πρέπει να είναι ισοδύναμη ή καλύτερη από εκείνη του θετικού μάρτυρα με ίδια αραίωση αντισώματος. Κύτταρα με ατελή χρώση ή με ασθενή φθορισμό δεν πρέπει να λαμβάνονται υπόψη.

Εάν υπάρχει υποψία επιμόλυνσης, η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί. Κάτι τέτοιο υπάρχει περίπτωση να συμβεί εάν όλες οι αντικειμενοφόροι μιας παρτίδας δείχνουν θετικά κύτταρα λόγω της επιμόλυνσης του ρυθμιστικού διαλύματος ή εάν βρεθούν θετικά κύτταρα (εκτός των φατνίων της αντικειμενοφόρου) στην επικάλυψη της αντικειμενοφόρου.

4.4.3. Υπάρχουν διάφορα προβλήματα σύμφυτα με την εξειδίκευση της δοκιμής ανοσοφθορισμού. Τα ιζήματα των κώνων από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου και των τμημάτων του στελέχους περιέχουν συχνά πληθυσμούς φθοριζόντων κυττάρων μη τυπικής μορφολογίας καθώς και μη ειδικώς αντιδρώντα σαπροφυτικά βακτήρια όμοιου μεγέθους και μορφολογίας με το C. m. subsp. sepedonicus.

4.4.4. Λαμβάνονται υπόψη μόνον τα φθορίζοντα κύτταρα τυπικού μεγέθους και μορφολογίας στον τίτλο ή την αραίωση εργασίας των αντισωμάτων όπως στο σημείο 4.3.

4.4.5. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων IF:

i) Εάν βρίσκονται λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με χαρακτηριστική μορφολογία, εκτιμάται ο μέσος αριθμός τυπικών κυττάρων ανά πεδίο μικροσκοπίου και υπολογίζεται ο αριθμός των τυπικών κυττάρων ανά ml του αναδιαλυμένου ιζήματος (Προσάρτημα 4).

Η ανάγνωση IF είναι θετική για δείγματα με τουλάχιστον 5x103 τυπικά κύτταρα ανά ml του αναδιαλυμένου ιζήματος. Το δείγμα θεωρείται ενδεχομένως μολυσμένο και απαιτείται η διενέργεια περαιτέρω δοκιμών.

ii) Η ανάγνωση IF είναι αρνητική για δείγματα με λιγότερα από 5x103 κύτταρα ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος και το δείγμα θεωρείται αρνητικό. Δεν απαιτείται η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών.

5. Δοκιμή FISH

Αρχή

Όταν η δοκιμή FISH χρησιμοποιείται ως αρχική δοκιμή διαλογής και τα αποτελέσματα είναι θετικά, πρέπει να πραγματοποιηθεί η δοκιμή IF ως δεύτερη υποχρεωτική δοκιμή διαλογής. Όταν η δοκιμή FISH χρησιμοποιείται ως δεύτερη δοκιμή διαλογής και έχει θετικά αποτελέσματα, απαιτείται διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών σύμφωνα με το διάγραμμα ροής για την ολοκλήρωση της διάγνωσης.

Σημείωση:

Χρησιμοποιούνται επικυρωμένοι ολιγοανιχνευτές ειδικοί για το C. m. subsp. sepedonicus (Προσάρτημα 7). Οι προκαταρκτικές δοκιμές με τη μέθοδο αυτή θα πρέπει να επιτρέπουν την αναπαραγώγιμη ανίχνευση τουλάχιστον 103-104 κυττάρων του C. m. subsp. sepedonicus ανά ml που προστίθενται σε εκχυλίσματα δειγμάτων που προηγουμένως ήταν αρνητικά στη δοκιμή.

Η ακόλουθη διαδικασία είναι προτιμότερο να πραγματοποιείται σε εκχύλισμα δείγματος που έχει μόλις παρασκευασθεί αλλά είναι επίσης δυνατόν να πραγματοποιηθεί με επιτυχία σε εκχύλισμα δείγματος που έχει αποθηκευθεί με γλυκερίνη στους -16 έως -24 °C ή στους -68 έως -86 °C.

Ως αρνητικοί μάρτυρες, χρησιμοποιούνται κατάλληλες ποσότητες εκχυλίσματος δείγματος που προηγουμένως ήταν αρνητικό στις δοκιμές για το C. m. subsp. sepedonicus.

Ως θετικοί μάρτυρες, παρασκευάζονται αιωρήματα που περιέχουν 105 έως 106 κύτταρα ανά ml του C. m. subsp. sepedonicus (π.χ. στέλεχος NCPPB 4053 ή PD 406) σε 0,01M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PB) από καλλιέργεια 3-5 ημερών (για την παρασκευή βλέπε Προσάρτημα 2). Παρασκευάζονται ξεχωριστά ως θετικοί μάρτυρες αντικειμενοφόροι πλάκες από ομόλογο στέλεχος ή άλλο στέλεχος αναφοράς του C. m. subsp. sepedonicus, που έχει γίνει αιώρημα σε εκχύλισμα πατάτας, όπως περιγράφεται στο Προσάρτημα 2.

Η χρήση ολιγοανιχνευτή ευβακτηρίων σημασμένου με FITC παρέχει μάρτυρα για τη διαδικασία υβριδισμού, καθώς χρωματίζει όλα τα ευβακτήρια που βρίσκονται στο δείγμα.

Το υλικό των μαρτύρων δοκιμάζεται με τρόπο ταυτόσημο με εκείνο του ή των δειγμάτων.

5.1. Προσήλωση του εκχυλίσματος πατάτας

Το ακόλουθο πρωτόκολλο βασίζεται στον Wullings et al., (1998):

5.1.1. Παρασκευάζεται το προσηλωτικό διάλυμα (βλέπε Προσάρτημα 7).

5.1.2. Φέρονται με σιφώνιο 100 μl κάθε εκχυλίσματος δείγματος σε σωλήνα Eppendorf και φυγοκεντρούνται για 8 λεπτά σε 7000 g.

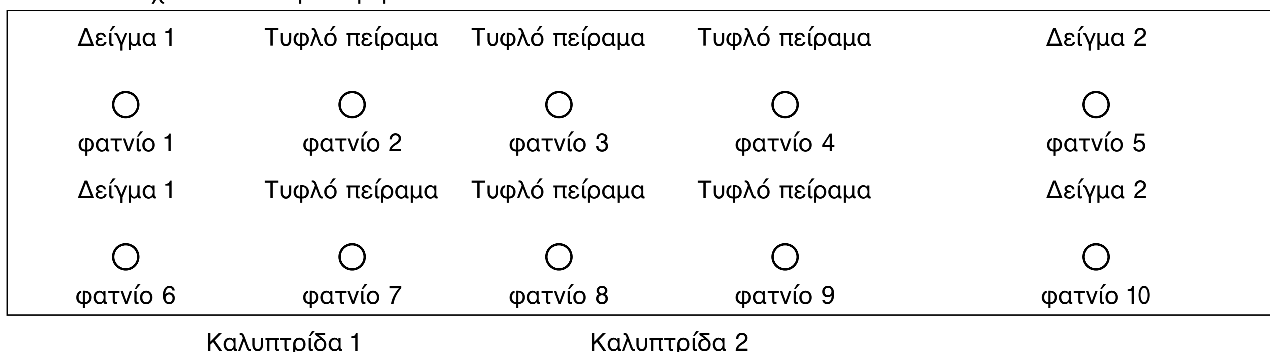
5.1.3. Αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα διαλύεται σε 500 μl προσηλωτικού υγρού που έχει παρασκευασθεί λιγότερο από 24 ώρες πριν. Ανακατεύουμε με στροβιλισμό (vortex) και επωάζουμε για μία νύκτα στους 4 °C.

Εναλλακτικό προσηλωτικό υγρό είναι διάλυμα 96% αιθανόλης. Για τη χρησιμοποίησή του το ίζημα, από το βήμα 5.1.2 διαλύεται σε 50 μl 0,01M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PB) και 50 μl 96% αιθανόλης. Ανακατεύουμε με στροβιλισμό (vortex) και επωάζουμε στους 4 °C για 30-60 λεπτά.

5.1.4. Φυγοκεντρείται για 8 λεπτά σε 7000 g, αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα αναδιαλύεται σε 75 μl 0,01M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PB) (βλέπε Προσάρτημα 3).

5.1.5. Τοποθετούνται κατά κηλίδες 16 μl των προσηλωμένων αιωρημάτων σε καθαρή αντικειμενοφόρο πολλαπλών δοκιμών όπως φαίνεται στην Εικόνα 3. Εφαρμόζονται 2 διαφορετικά, μη αραιωμένα, δείγματα ανά αντικειμενοφόρο και χρησιμοποιούνται 10 μl για τη δημιουργία αραίωσης 1:100 [σε 0,01M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PB)]. Το εναπομείναν διάλυμα δείγματος (49 μl) μπορεί να αποθηκευθεί στους - 20°C μετά την προσθήκη 1 όγκου 96% αιθανόλης. Στην περίπτωση που η δοκιμή FISH πρέπει να επαναληφθεί, αφαιρείται η αιθανόλη με φυγοκέντριση και προστίθεται ίσος όγκος 0,01M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PB) [αναμιγνύουμε με στροβιλισμό (vortex)]

Εικόνα 3. Σχέδιο αντικειμενοφόρου FISH



5.1.6. Οι αντικειμενοφόροι στεγνώνουν στον αέρα (ή σε στεγνωτήρα αντικειμενοφόρου στους 37 ^{0}C) και προσηλώνονται με διέλευση από φλόγα.

Στο στάδιο αυτό η διαδικασία είναι δυνατόν να διακοπεί και να συνεχισθεί ο υβριδισμός την επόμενη ημέρα. Οι αντικειμενοφόροι πρέπει να αποθηκεύονται απαλλαγμένες από σκόνη και στεγνές σε θερμοκρασία δωματίου.

5.2. Προϋβριδισμός και υβριδισμός

5.2.1. Παρασκευάζεται διάλυμα λυσοζύμης που περιέχει 10mg λυσοζύμης (Sigma L-6876) σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος (100mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH8.0). Το διάλυμα αυτό μπορεί να αποθηκευθεί αλλά επιτρέπεται να καταψυχθεί και να αποψυχθεί μόνον μία φορά. Το φατνίο κάθε δείγματος καλύπτεται με περίπου 50 μl διαλύματος λυσοζύμης και επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόροι βυθίζονται σε απιονισμένο νερό, μία μόνον φορά και στεγνώνονται με διηθητικό χαρτί.

Εναλλακτικά, αντί λυσοζύμης προστίθενται σε κάθε φατνίο 50 μl διαλύματος 40-400μg ml^{-1} πρωτεάσης K σε ρυθμιστικό διάλυμα (20 mM Tris-HCl, 2mM $CaCl_2$, pH 7,4) και επωάζουμε σε 37 ^{0}C για 30 λεπτά.

5.2.2. Τα κύτταρα αφυδατώνονται σε διαβαθμισμένη σειρά αιθανόλης των 50%, 80% και 96% για ένα λεπτό σε κάθε μία. Οι αντικειμενοφόροι στεγνώνονται στον αέρα σε υποδοχέα αντικειμενοφόρων.

5.2.3. Παρασκευάζεται ένας υγρός θάλαμος επώασης με κάλυψη του πυθμένα ενός αεροστεγούς δοχείου με απορροφητικό ή διηθητικό χαρτί που έχει εμβαπτισθεί σε 1x μείγμα υβριδισμού (hybmix) (Προσάρτημα 7). Το δοχείο προεπωάζεται στον κλίβανο υβριδισμού στους 55 ^{0}C για τουλάχιστον 10 λεπτά.

5.2.4. Παρασκευάζεται το διάλυμα υβριδισμού (Προσάρτημα 7) θεωρώντας 45 μl ανά αντικειμενοφόρο πλάκα και προεπωάζεται για 5 λεπτά στους 55 ^{0}C.

5.2.5. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες τοποθετούνται σε θερμή πλάκα θερμοκρασίας 45 ^{0}C και εφαρμόζονται 10 μl διαλύματος υβριδισμού σε καθένα από τα 4 φατνία στην(-ις) αντικειμενοφόρο(-ους).

5.2.6. Εφαρμόζονται 2 καλυπτρίδες (24 x 24 mm) σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα χωρίς να εγκλωβιστεί αέρας. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες τοποθετούνται στον προθερμασμένο υγρό θάλαμο και ο υβριδισμός πραγματοποιείται όλη τη νύκτα στον κλίβανο σε θερμοκρασία 55 ^{0}C στο σκοτάδι.

5.2.7. Παρασκευάζονται 3 ποτήρια ζέσεως που περιέχουν αντίστοιχα 1 l υπέρ καθαρό νερό (UPW), 1 l από 1x hybmix (334 ml 3x hybmix και 666 ml UPW) και 1 l από 1/2x hybmix (167 ml 3x hybmix και 833 ml UPW). Έκαστο προεπωάζεται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 55^{0}C.

5.2.8. Απομακρύνονται οι καλυπτρίδες από τις αντικειμενοφόρους πλάκες και οι αντικειμενοφόροι πλάκες τοποθετούνται στον υποδοχέα αντικειμενοφόρων.

5.2.9. Ξεπλένεται η περίσσεια ανιχνευτού με επώαση για 15 λεπτά στο ποτήρι ζέσεως με 1x hybmix στους 55 ^{0}C.

5.2.10. Ο υποδοχέας αντικειμενοφόρων πλακών μεταφέρεται σε διάλυμα πλυσίματος 1/2 hybmix και επωάζουμε για 15 λεπτά ακόμη.

5.2.11. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες βυθίζονται για σύντομο χρονικό διάστημα σε UPW και τοποθετούνται σε διηθητικό χαρτί. Η περίσσεια υγρασίας απομακρύνεται καλύπτοντας την επιφάνεια απαλά με διηθητικό χαρτί. Προστίθενται με σιφώνιο 5-10 μl αντιξεθωριαστικού διαλύματος έγκλεισης (e.g. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA ή ισοδύναμα) σε κάθε φατνίο και εφαρμόζεται μεγάλη καλυπτρίδα (24 x 60 mm) σε ολόκληρη την αντικειμενοφόρο πλάκα.

5.3. Ανάγνωση της δοκιμής FISH

5.3.1. Εξετάζονται οι αντικειμενοφόροι πλάκες αμέσως με μικροσκόπιο προσαρμοσμένο για μικροσκοπία επιφθορισμού σε μεγένθυση 630 ή 1000x με έλαιο κατάδυσης. Με φίλτρο κατάλληλο για ισοθειοκυανική φθορεϊσίνη (FITC), τα ευβακτηριακά κύτταρα (συμπεριλαμβανομένων των περισσοτέρων αρνητικών κατά Gram κυττάρων) στο δείγμα είναι χρωσμένα πράσινα φθορίζοντα. Εάν χρησιμοποιηθεί φίλτρο 5-ισοθειοκυανικής τετραμεθυλοροδαμίνης, τα κύτταρα του C. m. subsp. sepedonicus που έχουν χρωσθεί με Cy3 εμφανίζονται φθορίζοντα κόκκινα. Συγκρίνεται η μορφολογία των κυττάρων με αυτή των θετικών μαρτύρων. Τα κύτταρα πρέπει να είναι πλήρως χρωσμένα με λαμπρό φθορισμό. Η δοκιμή FISH (ενότητα 9.4) πρέπει να επαναληφθεί αν η χρώση παρεκκλίνει. Τα φατνία εξετάζονται κατά δύο κάθετες διαμέτρους και κατά την περίμετρό τους. Όσον αφορά τα δείγματα που δεν δείχνουν καθόλου κύτταρα ή δείχνουν μικρό αριθμό κυττάρων, πρέπει να παρατηρηθούν τουλάχιστον 40 πεδία μικροσκοπίου.

5.3.2. Εξετάζεται εάν υπάρχουν λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με τη χαρακτηριστική μορφολογία του C. m. subsp. sepedonicus στα φατνία δοκιμής των αντικειμενοφόρων δοκιμής (βλέπε ιστοχώρο: http://forum.europa.eu.int/Public/sanco/Home/main). Η ένταση του φθορισμού πρέπει να είναι ισοδύναμη ή καλύτερη από αυτήν της χρώσης των θετικών μαρτύρων. Κύτταρα με ατελή χρώση ή με ασθενή φθορισμό δεν πρέπει να λαμβάνονται υπόψη.

5.3.3. Εάν υπάρχει υπόνοια επιμόλυνσης, η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί. Αυτό μπορεί να ισχύει εάν όλες οι αντικειμενοφόροι μιας παρτίδας δείχνουν θετικά κύτταρα λόγω επιμόλυνσης του ρυθμιστικού διαλύματος ή εάν βρεθούν θετικά κύτταρα (εκτός των φατνίων της αντικειμενοφόρου) στην επικάλυψη της αντικειμενοφόρου.

5.3.4. Υπάρχουν διάφορα προβλήματα σύμφυτα με την εξειδίκευση της δοκιμής FISH. Τα ιζήματα των κώνων από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου και των τμημάτων των στελεχών ενδέχεται να περιέχουν αν και λιγότερο συχνά απ'ότι στη δοκιμή IF πληθυσμούς φθοριζόντων κυττάρων μη τυπικής μορφολογίας καθώς και μη ειδικώς αντιδρώντα σαπροφυτικά βακτήρια όμοιου μεγέθους και μορφολογίας με το C. m. subsp. sepedonicus

5.3.5. Λαμβάνονται υπόψη μόνον τα φθορίζοντα κύτταρα με τυπικό μέγεθος και μορφολογία, βλέπε 5.3.2.

5.3.6. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών FISH:

i) Έγκυρα αποτελέσματα από τη δοκιμή FISH παρέχονται όταν, χρησιμοποιώντας φίλτρο FITC, παρατηρούνται κύτταρα που είναι χρωσμένα με λαμπρό φθορίζον πράσινο χρώμα και διαθέτουν το τυπικό μέγεθος και μορφολογία του C. m. subsp. sepedonicus και όταν, χρησιμοποιώντας φίλτρο ροδαμίνης, παρατηρούνται κύτταρα χρωσμένα με λαμπρό φθορίζον κόκκινο χρώμα σε όλους τους θετικούς μάρτυρες και σε κανέναν αρνητικό μάρτυρα. Εάν σε ένα δείγμα εντοπίζονται λαμπρώς φθορίζοντα κύτταρα με χαρακτηριστική μορφολογία, εκτιμάται ο μέσος αριθμός τυπικών κυττάρων ανά πεδίο μικροσκοπίου και υπολογίζεται ο αριθμός των τυπικών κυττάρων ανά ml του αναδιαλυμένου ιζήματος (Προσάρτημα 4). Τα δείγματα με λιγότερα από 5x103 τυπικά κύτταρα ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος θεωρούνται αρνητικά.

ii) Η δοκιμή FISH είναι αρνητική εάν κύτταρα χρωσμένα με λαμπρό φθορίζον κόκκινο χρώμα, τυπικό μέγεθος και μορφολογία του C. m. subsp. sepedonicus, δεν παρατηρούνται με φίλτρο ροδαμίνης, υπό την προϋπόθεση ότι τυπικά κύτταρα χρωσμένα με λαμπρό φθορίζον κόκκινο χρώμα παρατηρούνται στα παρασκευάσματα θετικών μαρτύρων όταν χρησιμοποιείται φίλτρο ροδαμίνης.

6. Δοκιμή PCR

Αρχές

Όταν η δοκιμή PCR χρησιμοποιείται ως αρχική δοκιμή διαλογής και έχει θετικά αποτελέσματα, πρέπει να πραγματοποιηθεί η δοκιμή IF ως δεύτερη υποχρεωτική δοκιμή διαλογής. Όταν η δοκιμή PCR χρησιμοποιείται ως δεύτερη δοκιμή διαλογής και έχει θετικά αποτελέσματα, απαιτείται διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών σύμφωνα με το διάγραμμα ροής για την ολοκλήρωση της διάγνωσης.

Η πλήρης αξιοποίηση της μεθόδου αυτής ως αρχικής δοκιμής διαλογής συνιστάται μόνον όταν έχει αποκτηθεί εξειδικευμένη εμπειρία.

Σημείωση:

Οι προκαταρκτικές δοκιμές με τη μέθοδο αυτή πρέπει να επιτρέπουν την αναπαραγώγιμη ανίχνευση τουλάχιστον 10^3 έως 10^4 κυττάρων του C. m. subsp. sepedonicus ανά ml που προστίθεται σε εκχυλίσματα δειγμάτων που προηγούμενως έδειξαν αρνητικά αποτελέσματα. Μπορεί να χρειασθούν πειράματα βελτιστοποίησης για την επίτευξη των μέγιστων επιπέδων ευαισθησίας και εξειδίκευσης σε όλα τα εργαστήρια.

Χρησιμοποιούνται επικυρωμένα αντιδραστήρια και πρωτόκολλα PCR. Επιλέγεται κατά προτίμηση μέθοδος με εσωτερικό μάρτυρα.

Λαμβάνονται οι κατάλληλες προφυλάξεις ώστε να αποφευχθεί η επιμόλυνση του δείγματος με DNA στόχο. Η δοκιμή PCR θα πρέπει να πραγματοποιείται από πεπειραμένους τεχνικούς, σε καθιερωμένα εργαστήρια μοριακής βιολογίας, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης με DNA στόχο

Οι αρνητικοί μάρτυρες (για εξαγωγή DNA και PCR) πρέπει πάντοτε να χειρίζονται ως τελικά δείγματα στη διαδικασία, έτσι ώστε να καθίσταται φανερή ενδεχόμενη μεταφορά DNA.

Στη δοκιμή PCR πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθοι αρνητικοί μάρτυρες:

- εκχύλισμα δείγματος που προηγουμένως ήταν αρνητικό στη δοκιμή για το C. m. subsp. sepedonicus.
- μάρτυρες ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή του βακτηρίου και του DNA από το δείγμα.
- μείγμα αντίδρασης PCR.

Πρέπει να περιλαμβάνονται οι ακόλουθοι θετικοί μάρτυρες:

- κατάλληλες ποσότητες αναδιαλυμένων ιζημάτων στις οποίες έχει προστεθεί το C. m. subsp. sepedonicus (για την παρασκευή βλέπε Προσάρτημα 2).
- αιώρημα 106 κυττάρων ανά ml νερού παθογόνου απομόνωσης του C. m. subsp. sepedonicus (π.χ. NCPPB 2140 ή NCPPB 4053).
- εάν είναι δυνατόν, χρησιμοποιείται επίσης DNA από δείγματα θετικών μαρτύρων κατά τη διενέργεια της δοκιμής PCR.

Για την αποφυγή πιθανής επιμόλυνσης παρασκευάζονται θετικοί μάρτυρες σε ξεχωριστό περιβάλλον από τα δείγματα προς δοκιμή.

Τα εκχυλίσματα δείγματος πρέπει να έχουν απαλλαγεί στο μέγιστο δυνατό βαθμό από χώμα. Για το λόγο αυτό, συστήνεται σε ορισμένες περιπτώσεις να προετοιμάζονται οι εξαγωγές από πλυμένες πατάτες εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν πρωτόκολλα PCR.

6.1. Μέθοδοι καθαρισμού DNA

Χρησιμοποιούνται δείγματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Η παρασκευή του υλικού των μαρτύρων γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως εκείνη του ή των δειγμάτων.

Υπάρχουν διάφορες διαθέσιμες μέθοδοι για τον καθαρισμό του DNA στόχου από σύνθετα υποστρώματα δειγμάτων, απομακρύνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τους παρεμποδιστές της PCR και άλλων ενζυματικών αντιδράσεων και συγκεντρώνοντας το DNA στόχο στο εκχύλισμα δείγματος.

Η ακόλουθη μέθοδος έχει βελτιστοποιηθεί με σκοπό τη χρήση με την επικυρωμένη μέθοδο PCR που περιγράφεται στο Προσάρτημα 6.

6.1.α) Μέθοδος Pastrik (2000):

1. Προστίθενται με σιφώνιο 220 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0]) σε σωλήνα Eppendorf 1,5 ml.

2. Προστίθενται 100 μl εκχυλίσματος δείγματος και τοποθετούνται σε θερμικό μπλοκ ή υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95 ^{0}C για 10 λεπτά.

3. Ο σωλήνας τοποθετείται σε πάγο για 5 λεπτά.

4. Προστίθενται 80 μl πυκνού διαλύματος λυσοζύμης (50 mg λυσοζύμη ανά ml σε 10 mM Tris HCl, pH 8.0) και επωάζονται στους 37 °C για 30 λεπτά.

5. Προστίθενται 220 μl διαλύματος A Easy DNA® (Invitrogen), αναμειγνύονται καλά σε συσκευή vortex και επωάζονται στους 65 °C για 30 λεπτά.

6. Προστίθενται 100 μl διαλύματος B Easy DNA® (Invitrogen), αναμειγνύονται με ένταση σε συσκευή vortex έως ότου το ίζημα να ρέει ελεύθερα στο σωλήνα και το δείγμα να είναι ομοιόμορφα ιξώδες.

7. Προστίθενται 500 μl χλωροφόρμιου και αναμειγνύουμε με στροβιλισμό (vortex) έως ότου μειωθεί το ιξώδες και το μείγμα είναι ομοιογενές.

8. Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 15.000 g για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C για το διαχωρισμό των φάσεων και τη δημιουργία της ενδιάμεσης φάσης.

9. Η άνω φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα Eppendorf.

10. Προστίθεται 1 ml από 100% αιθανόλη (-20° C), αναμειγνύεται με στροβιλισμό (vortex) για σύντομο χρονικό διάστημα και επωάζεται σε πάγο για 10 λεπτά.

11. Φυγοκεντρείται σε 15.000 g για 20 λεπτά στους 4° C και απομακρύνεται η αιθανόλη από το ίζημα.

12. Προστίθενται 500 μl 80% αιθανόλης (-20° C) και αναμειγνύουμε αναποδογυρίζοντας το σωλήνα.

13. Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 15.000 g για 10 λεπτά στους 4°C διατηρείται το ίζημα και απομακρύνεται η αιθανόλη.

14. Αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει στον αέρα ή σε DNA Speed Vac.

15. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 100 μl αποστειρωμένου UPW και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 20 λεπτά.

16. Αποθηκεύεται στους -20° C έως ότου χρειασθεί να χρησιμοποιηθεί για την PCR.

17. Καθιζάνεται με φυγοκέντριση οιοδήποτε λευκό ίζημα και χρησιμοποιούνται 5 μl του υπερκείμενου υγρού που περιέχει DNA για την PCR.

6.1.β) Άλλες μέθοδοι

Είναι δυνατόν να εφαρμοσθούν άλλες μέθοδοι εξαγωγής DNA (π.χ. Qiagen DNeasy Plant Kit) με την προϋπόθεση ότι έχει αποδειχθεί πως είναι εξίσου αποτελεσματικές για τον καθαρισμό DNA από δείγματα μαρτύρων που περιέχουν 103 έως 104 κύτταρα παθογόνου ανά ml.

6.2. PCR

6.2.1. Τα προς δοκιμή πρότυπα και εκείνα των μαρτύρων παρασκευάζονται για την PCR σύμφωνα με το επικυρωμένο πρωτόκολλο (Προσάρτημα 6). Παρασκευάζεται μια δεκαδική αραίωση εκχυλίσματος DNA δείγματος (1:10 σε UPW).

6.2.2. Παρασκευάζεται το κατάλληλο μείγμα αντίδρασης PCR σε περιβάλλον απαλλαγμένο από επιμολύνσεις σύμφωνα με το δημοσιευμένο πρωτόκολλο (Προσάρτημα 6). Το επικυρωμένο πρωτόκολλο PCR είναι μια πολλαπλή αντίδραση που ενσωματώνει επίσης έναν εσωτερικό μάρτυρα PCR.

6.2.3. Προσθέτουμε 5 μl εκχυλίσματος DNA ανά 25 μl αντίδρασης PCR σε αποστειρωμένους σωλήνες PCR.

6.2.4. Ενσωματώνεται δείγμα αρνητικού μάρτυρα που περιέχει μόνον μείγμα αντίδρασης PCR και προστίθεται η ίδια πηγή UPW που χρησιμοποιήθηκε στο μείγμα PCR αντί για δείγμα.

6.2.5. Οι σωλήνες τοποθετούνται στον ίδιο θερμικό κυκλοποιητή που χρησιμοποιήθηκε στην προκαταρκτική δοκιμή και αρχίζει το καταλλήλως βελτιστοποιημένο πρόγραμμα PCR (Προσάρτημα 6).

6.3. Ανάλυση του προϊόντος PCR

6.3.1. Τα αμπλικόνια της PCR αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Τοποθετούνται για μετακίνηση τουλάχιστον 12 μl μείγματος αντίδρασης ενισχυμένου DNA από κάθε δείγμα αναμεμειγμένα με 3 μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (Προσάρτημα 6) σε 2,0% (β/ο) πηκτές αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα τρις-Οξικού-EDTA (TAE) (Προσάρτημα 6) σε 5-8 V ανά cm. Χρησιμοποιείται ένας κατάλληλος δείκτης DNA, π.χ. DNA σε βαθμίδες ανά 100 bp.

6.3.2. Οι ζώνες DNA αποκαλύπτονται διά χρώσεως σε βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 mg ανά L) για 30-45 λεπτά λαμβάνοντας τις απαραίτητες προφυλάξεις κατά το χειρισμό αυτού του μεταλλαξιογόνου.

6.3.3. Η χρωσμένη πηκτή εξετάζεται υπό υπεριώδη ακτινοβολία μικρού μήκους κύματος (π.χ. λ = 302 nm) για ενισχυμένα προϊόντα PCR του αναμενόμενου μεγέθους (Προσάρτημα 6) και σημειώνονται τα αποτελέσματα.

6.3.4. Για όλα τα νέα ευρήματα/περιπτώσεις, επιβεβαιώνεται η αυθεντικότητα του αμπλικονίου PCR με την πραγματοποίηση ανάλυσης με ένζυμο περιορισμού σε δείγμα του εναπομείναντος ενισχυμένου DNA με επώαση στη βέλτιστη θερμοκρασία και χρόνο με το κατάλληλο ένζυμο και ρυθμιστικό διάλυμα (βλέπε Προσάρτημα 6). Τα τμήματα που υπέστησαν πέψη αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης όπως προηγουμένως και παρατηρείται υπό υπεριώδη ακτινοβολία το χαρακτηριστικό πρότυπο του θραύσματος περιορισμού μετά τη χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και συγκρίνεται με το θετικό μάρτυρα που δεν υπέστη πέψη και το θετικό μάρτυρα που υπέστη πέψη.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών PCR:

Η δοκιμή PCR είναι αρνητική εάν το αναμενόμενου μεγέθους, ειδικό για το C. m. subsp. sepedonicus αμπλικόνιο PCR δεν ανιχνευθεί για το εν λόγω δείγμα αλλά ανιχνευθεί για όλα τα δείγματα θετικών μαρτύρων (στην περίπτωση πολλαπλής PCR με εκκινητές εσωτερικών μαρτύρων ειδικούς για φυτά: πρέπει να ενισχυθεί ένα δεύτερο, αναμενόμενου μεγέθους, προϊόν PCR με το εν λόγω δείγμα).

Η δοκιμή PCR είναι θετική εάν ανιχνευθεί το ειδικό για το C. m. subsp. sepedonicus αμπλικόνιο της PCR στο αναμενόμενο μέγεθος και πρότυπο περιορισμού (όταν αυτό απαιτείται), εφόσον δεν έχει ενισχυθεί από οιοδήποτε εκ των δειγμάτων αρνητικών μαρτύρων. Η αξιόπιστη επιβεβαίωση τυχόν θετικού αποτελέσματος είναι δυνατόν να επιτευχθεί επίσης με την επανάληψη της δοκιμής με δεύτερο σετ εκκινητών PCR (ενότητα 9.3).

Σημείωση:

Μπορεί να υπάρξουν υπόνοιες για παρεμπόδιση της PCR εάν το αναμενόμενο αμπλικόνιο αποκτηθεί από το δείγμα θετικού μάρτυρα που περιέχει C. m. subsp. sepedonicus σε ύδωρ αλλά προκύπτουν αρνητικά αποτελέσματα από θετικούς μάρτυρες με C. m. subsp. sepedonicus σε εκχύλισμα πατάτας. Στα πρωτόκολλα πολλαπλής PCR με εσωτερικούς ελέγχους PCR, υπάρχει ένδειξη για παρεμπόδιση της αντίδρασης εάν δεν προκύψει κανένα από τα δύο αμπλικόνια.

Υπάρχει υπόνοια για επιμόλυνση εάν το αναμενόμενο αμπλικόνιο προκύψει από έναν ή περισσότερους αρνητικούς μάρτυρες.

7. ΒΙΟΔΟΚΙΜΗ

Σημείωση:

Οι προκαταρκτικές δοκιμές με τη μέθοδο αυτή θα πρέπει να καθιστούν δυνατή την αναπαραγώγιμη ανίχνευση 103 έως 104 μονάδων του C. m. subsp. sepedonicus που σχηματίζουν αποικίες ανά ml που προστίθεται σε εκχυλίσματα δειγμάτων που προηγουμένως ήταν αρνητικά στις δοκιμές (για την παρασκευή βλέπε Προσάρτημα 2).

Η ύψιστη ευαισθησία της ανίχνευσης μπορεί να αναμένεται όταν χρησιμοποιείται εκχύλισμα δείγματος που έχει μόλις παρασκευασθεί και υπάρχουν οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Ωστόσο, η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί επιτυχώς σε εκχυλίσματα που έχουν αποθηκευθεί σε γλυκερίνη στους -68 έως -86^{0} C.

Ορισμένες ποικιλίες φυτών μελιτζάνας αποτελούν εξαιρετικό υπόστρωμα εκλεκτικού εμπλουτισμού για την ανάπτυξη του C. m. subsp. sepedonicus ακόμη και ελλείψει συμπτωμάτων και αποτελούν εξαιρετική δοκιμή επιβεβαίωσης στον ξενιστή.

Οι συνθήκες ανάπτυξης πρέπει να είναι βέλτιστες έτσι ώστε να είναι μειωμένος ο κίνδυνος λανθασμένων αρνητικών αποτελεσμάτων της δοκιμής.

Για τις λεπτομέρειες καλλιέργειας, βλέπε Προσάρτημα 8.

7.1. Διανέμεται το σύνολο της εναπομείνασας ποσότητας δοκιμής του αναδιαλυμένου ιζήματος της ενότητας 3.1.6 ή 3.2.5 μεταξύ φυτών μελιτζάνας με μία από τις μεθόδους που δίδονται παρακάτω (7.3 ή 7.4). Χρησιμοποιούνται μόνον τα φυτά στο στάδιο του 2-3ου πραγματικού φύλλου έως την πλήρη ανάπτυξη του τρίτου πραγματικού φύλλου. Για την εξασφάλιση της πλήρους χρήσης του αναδιαλυμένου ιζήματος καθώς και της αποτελεσματικής μόλυνσης, απαιτούνται 15-25 φυτά μελιτζάνας ανά δείγμα για τις διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω.

7.2. Τα φυτά μελιτζάνας δεν ποτίζονται για 1 έως 2 ημέρες πριν την μόλυνση προκειμένου να μειωθεί η πίεση σπαργής.

7.3. Μόλυνση σχισμής

7.3.1. Το φυτό συγκρατείται μεταξύ δύο δακτύλων και μια σταγόνα (περίπου 5-10 μl) του αιωρήματος του ιζήματος τοποθετείται με σιφώνιο επί του στελέχους, μεταξύ των κοτυληδόνων και του πρώτου φύλλου.

7.3.2. Με ένα αποστειρωμένο νυστέρι, πραγματοποιείται στο στέλεχος μια διαγώνια σχισμή, μήκους 1,0 cm και βάθους ίσου προς τα 2/3 περίπου της διαμέτρου του στελέχους, αρχίζοντας την τομή από τη σταγόνα του ιζήματος.

7.3.3. Η τομή καλύπτεται με αποστειρωμένη βαζελίνη από μια σύριγγα.

7.4. Μόλυνση με σύριγγα

Τα στελέχη των φυτών μελιτζάνας μολύνονται ακριβώς πάνω από τις κοτυληδόνες με μια σύριγγα με υποδερμική βελόνα (τουλάχιστον 23G). Το δείγμα κατανέμεται μεταξύ των φυτών μελιτζάνας.

7.5. Ως θετικοί μάρτυρες, μολύνονται 5 φυτά με υδατικό αιώρημα 105 έως 106 κυττάρων ανά ml γνωστής καλλιέργειας του C. m. subsp. sepedonicus και, όπου είναι δυνατόν, με φυσικώς μολυσμένους ιστούς κονδύλων (βλέπε ενότητα 4) με την ίδια μέθοδο μόλυνσης (7.3 ή 7.4).

7.6. Ως αρνητικοί μάρτυρες, μολύνονται 5 φυτά με αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος με την ίδια μέθοδο μόλυνσης (7.3 ή 7.4).

7.7. Τα φυτά επωάζονται σε εγκαταστάσεις καραντίνας για χρονικό διάστημα μέχρι 4 εβδομάδων σε θερμοκρασία 18 - 24 ^{0}C. Τα φυτά επωάζονται με επαρκές φως και υψηλή υγρασία (70 - 80%) και ποτίζονται για την αποφυγή υπεράρδευσης ή μάρανσης λόγω έλλειψης νερού. Τα κύτταρα του C. m. ssp. sepedonicus νεκρώνονται σε θερμοκρασίες άνω των 30^{0}C και η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 21^{0}C. Για την αποφυγή της επιμόλυνσης, επωάζονται τα φυτά θετικών και αρνητικών μαρτύρων σε σαφώς διαχωρισμένους πάγκους σε θερμοκήπιο ή θάλαμο ανάπτυξης ή, εάν ο χώρος είναι περιορισμένος, εξασφαλίζεται ο αυστηρός διαχωρισμός μεταξύ των χειρισμών. Εάν πρέπει να επωασθούν φυτά για διαφορετικά δείγματα το ένα κοντά στο άλλο, διαχωρίζονται με κατάλληλα παραπετάσματα. Κατά τη λίπανση, το πότισμα, την επιθεώρηση και οιουσδήποτε άλλους χειρισμούς πρέπει να δίδεται εξαιρετική προσοχή ώστε να αποφεύγεται τυχόν επιμόλυνση. Είναι σημαντικό να διατηρούνται τα θερμοκήπια και οι θάλαμοι ανάπτυξης απαλλαγμένα από όλα τα έντομα εχθρούς καθώς μπορεί να μεταδίδουν το βακτήριο από δείγμα σε δείγμα.

7.8. Ελέγχονται τακτικά για συμπτώματα μετά από μία εβδομάδα. Μετράται ο αριθμός των φυτών που παρουσιάζουν συμπτώματα. Στα φυτά μελιτζάνας, το C. m. subsp. sepedonicus προκαλεί μαρασμό των φύλλων, ο οποίος μπορεί να αρχίσει ως περιμετρική ή μεσονεύρια έλλειψη σπαργής. Οι μαραμένοι ιστοί ενδέχεται να είναι αρχικά βαθυπράσινοι ή μωσαϊκόμορφοι, αλλά στη συνέχεια γίνονται χλωρωτικοί πριν νεκρωθούν. Συχνά, οι μαραμένοι ιστοί μεταξύ των νευρώσεων έχουν λιπώδη και βρεγμένη εμφάνιση. Η περίμετρος των νεκρωτικών ιστών είναι συχνά έντονα κίτρινη. Τα φυτά δεν νεκρώνονται πάντοτε· όσο μεγαλύτερη είναι η περίοδος πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα επιβίωσης. Τα φυτά είναι δυνατόν να επιζήσουν της μόλυνσης. Τα νεαρά φυτά μελιτζάνας είναι πολύ πιο ευαίσθητα σε χαμηλούς πληθυσμούς του C. m. subsp. sepedonicus από τα ηλικιωμένα φυτά και εξ'αυτού προκύπτει η αναγκαιότητα χρησιμοποίησης φυτών που είναι στο στάδιο των 3 πραγματικών φύλλων ή λίγο πριν απ'αυτό.

Μαρασμοί μπορεί επίσης να προκαλούνται από πληθυσμούς άλλων βακτηρίων ή μυκήτων που υπάρχουν στο ίζημα ιστών κονδύλων. Αυτά περιλαμβάνουν τα Ralstonia solanacearum, Erwinia carotovora subsp. carotovora και E. carotovora subsp. atroseptica, Erwinia chrysanthemi, Phoma exigua var. foveata, καθώς και μεγάλοι πληθυσμοί σαπροφυτικών βακτηρίων. Ιδιαίτερα το Erwinia chrysanthemi μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα των φύλλων και μάρανση που είναι σε μεγάλο βαθμό όμοια με τα συμπτώματα του C. m.ssp. sepedonicus. Η μόνη διαφορά είναι η μελάνωση των στελεχών στην περίπτωση των μολύνσεων από το Erwinia chrysanthemi. Άλλοι μαρασμοί μπορεί να διακριθούν από εκείνους που προκαλούνται από το C. m. subsp. sepedonicus λόγω του ότι μαραίνονται γρήγορα ολόκληρα φύλλα ή ολόκληρα φυτά. Είναι επίσης δυνατόν να παρασκευασθεί μια χρώ-

ση κατά Gram: η εν λόγω δοκιμή θα διαφοροποιήσει το C. m. subsp. sepedonicus από το Erwinia spp.

7.9. Μόλις παρατηρηθούν συμπτώματα στα φυτά μελιτζάνας, πρέπει να πραγματοποιηθεί εκ νέου απομόνωση, χρησιμοποιώντας τα τμήματα του μαραμένου ιστού των φύλλων ή του ιστού των στελεχών των φυτών (βλέπε 3.1.3. για τη διαβροχή των ιστών). Η επιφάνεια των φύλλων και των στελεχών των φυτών μελιτζάνας απολυμαίνεται με σφουγγάρι εμποτισμένο με 70% αιθανόλη. Πραγματοποιείται δοκιμή IF ή PCR στον χυμό των φυτών μελιτζάνας και απομονώνεται σε κατάλληλο (εκλεκτικό) υπόστρωμα (βλέπε ενότητα 8). Μπορεί επίσης να παρασκευασθεί μια χρώση κατά Gram (Προσάρτημα 9). Ταυτοποιούνται οι καθαρισμένες καλλιέργειες του πιθανού C. m. subsp. sepedonicus και επιβεβαιώνεται η παθογένεια (βλέπε ενότητα 9 και 10).

7.10. Υπό ορισμένες συνθήκες, ιδίως δε όταν οι συνθήκες ανάπτυξης δεν είναι άριστες, είναι δυνατόν για το C. m. subsp. sepedonicus να υπάρχει ως λανθάνουσα προσβολή στα φυτά μελιτζάνας ακόμη και μετά από επώαση 4 εβδομάδων. Εάν δεν παρατηρηθούν συμπτώματα μετά από 4 εβδομάδες, πραγματοποιείται δοκιμή IF/PCR σε σύνθετο δείγμα τμημάτων στελεχών μήκους 1 cm από κάθε φυτό δοκιμής που έχουν ληφθεί πάνω από το σημείο μόλυνσης. Εάν η δοκιμή είναι θετική, πρέπει να πραγματοποιηθεί εκ νέου απομόνωση σε κατάλληλο (εκλεκτικό) υπόστρωμα σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 8. Ταυτοποιούνται οι καθαρισμένες καλλιέργειες πιθανού C. m. subsp. sepedonicus και επιβεβαιώνεται η παθογένεια (βλέπε ενότητες 9 και 10).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της βιοδοκιμής:

Τα αποτελέσματα της βιοδοκιμής είναι έγκυρα όταν τα φυτά του θετικού μάρτυρα εμφανίζουν τυπικά συμπτώματα, τα βακτήρια είναι δυνατόν να απομονωθούν εκ νέου από τα εν λόγω φυτά και δεν εντοπίζονται συμπτώματα στους αρνητικούς μάρτυρες.

Η βιοδοκιμή είναι αρνητική εάν τα φυτά της δοκιμής δεν έχουν προσβληθεί από το C. m. subsp. sepedonicus και εάν το C. m. subsp. sepedonicus ανιχνεύεται στους θετικούς μάρτυρες.

Η βιοδοκιμή είναι θετική εάν τα φυτά δοκιμής είναι προσβεβλημένα από το C. m. subsp. sepedonicus.

8. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ C. M. SUPSP. SEPEDONICUS

Σημείωση:

Η διάγνωση ολοκληρώνεται μόνον εάν το C. m. subsp. sepedonicus έχει απομονωθεί, στη συνέχεια ταυτοποιηθεί (βλέπε ενότητα 9) και επιβεβαιωθεί μέσω δοκιμής παθογένειας (ενότητα 10). Μολονότι το C. m. subsp. sepedonicus είναι απαιτητικός οργανισμός, είναι δυνατόν να απομονωθεί από ιστούς που παρουσιάζουν συμπτώματα.

Ωστόσο, το βακτήριο αυτό μπορεί να καλυφθεί από ταχέως αναπτυσσόμενα σαπροφυτικά βακτήρια και, για το λόγο αυτό, είναι δύσκολη η απομόνωση απευθείας από το ίζημα ιστών κονδύλου ή στελέχους (ενότητα 3.1.6 ή 3.2.5). Με εκλεκτικό υπόστρωμα και την κατάλληλη αραίωση του αναδιαλυμένου ιζήματος από τους κώνους που έχουν αφαιρεθεί από τα σημεία πρόσφυσης των στολονίων της πατάτας ή τα στελέχη είναι δυνατή η άμεση απομόνωση του C. m. subsp. sepedonicus.

Οι απομονώσεις πραγματοποιούνται από όλα τα τμήματα συμπτωματικών κονδύλων ή στελεχών πατάτας καθώς και από φυτά μελιτζάνας στα οποία δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα αλλά η δοκιμή IF/PCR σύνθετου δείγματος είχε θετικά αποτελέσματα (βλέπε ενότητα 7.10). Όταν είναι απαραίτητο, η διαβροχή των στελεχών των φυτών μελιτζάνας πρέπει να γίνεται όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.1.3.

Ως θετικοί μάρτυρες, παρασκευάζονται δεκαδικές αραιώσεις από αιώρημα 106 cfu ανά ml του C. m. subsp. sepedonicus (π.χ. NCPPB 4053 ή PD 406). Για την αποφυγή ενδεχόμενης επιμόλυνσης, παρασκευάζονται θετικοί μάρτυρες πλήρως διαχωρισμένοι από τα δείγματα προς δοκιμή.

Η καταλληλότητα κάθε νέας παρτίδας εκλεκτικού υποστρώματος όσον αφορά την ανάπτυξη του παθογόνου πρέπει να ελέγχεται πριν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των συνήθων δειγμάτων

Η δοκιμή του υλικού των μαρτύρων γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως αυτή του ή των δειγμάτων

8.1. Εκλεκτική απομόνωση επί στερεού υποστρώματος

8.1.1. Από 100 μl κατάλληλης ποσότητας δείγματος αναδιαλυμένου ιζήματος πατάτας ή χυμού φυτών μελιτζάνας παρασκευάζονται 10πλές αραιώσεις σε ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος (Προσάρτημα 3).

8.1.2. Η απομόνωση από μη αραιωμένο ίζημα πατάτας αποτυγχάνει συνήθως λόγω της συνήθειας απαιτητικής ανάπτυξης του Cms και του ανταγωνισμού από τα σαπρόφυτα. Λόγω του ότι το βακτήριο υπάρχει συνήθως σε μεγάλους πληθυσμούς στους προσβεβλημένους ιστούς, τα σαπρόφυτα μπορούν συνήθως να αραιωθούν ενώ το παθογόνο παραμένει. Για το λόγο αυτό, συνιστάται να εξαπλωθούν, χρησιμοποιώντας εξαπλωτήρες [ράβδοι χόκεϋ (hockey sticks)] και την τεχνική εξάπλωσης σε τρυβλία (spread plate), 100 μl από κάθε δείγμα, σε αραιώσεις 1/100 έως 1/10000, σε υπόστρωμα MTNA ή NCP-88 (Προσάρτημα 5) (εάν χρησιμοποιούνται τρυβλία Petri διαμέτρου 90 mm - προσαρμόζεται ο όγκος για εναλλακτικά μεγέθη τρυβλίων).

Σημείωση:

Μια εναλλακτική στρατηγική είναι η εξάπλωση της αρχικής ποσότητας 100 μl ιζήματος πατάτας επί ενός πρώτου τρυβλίου agar με έναν εξαπλωτήρα. Στη συνέχεια μεταφέρεται ο εξαπλωτήρας σε ένα δεύτερο τρυβλίο agar, εξαπλώνοντας οιοδήποτε υπόλειμμα έχει μείνει στον εξαπλωτήρα η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται, τέλος, σε ένα τρίτο τρυβλίο, δίδοντας κατ'αυτόν τον τρόπο αποτέλεσμα αραιώσεως επί του υποστρώματος μέσω του εξαπλωτήρα.

8.1.3. Τα τρυβλία επωάζονται στο σκοτάδι στους 21-23 ^{0}C.

8.1.4. Οι αρχικές εξετάσεις των τρυβλίων, συμπεριλαμβανομένων, όσον αφορά τα τρυβλία των μαρτύρων, των μετρήσεων των αποικιών που είναι όμοιες με το C. m. subsp. sepedonicus, πραγματοποιούνται μετά από 3 ημέρες, ενώ περαιτέρω μετρήσεις γίνονται μετά από 5,7 και τελικά 10 ημέρες.

8.2. Καθαρισμός ύποπτων αποικιών

Σημείωση:

Η υποκαλλιέργεια αποικιών που μοιάζουν με C. m. subsp. sepedonicus πρέπει να διεξάγεται σε υπόστρωμα YGM για μόλυνση φυτών μελιτζάνας ή/και ακόλουθη ταυτοποίηση· αυτό πρέπει να γίνει προτού μεγαλώσει υπερβολικά η ανάπτυξη στα τρυβλία, δηλαδή κατά προτίμηση μετά από 3-5 ημέρες.

8.2.1. Οι αποικίες που μοιάζουν με εκείνες του C. m. subsp. sepedonicus διασπείρονται γραμμωτά σε ένα από τα ακόλουθα θρεπτικά υλικά (η σύνθεση των υποστρωμάτων δίδεται στο Προσάρτημα 5):

nutrient dextrose agar (μόνον για υποκαλλιέργεια)

yeast peptone glucose agar,

yeast extract mineral salts agar.

Επωάζουμε στους 21° C - 24° C μέχρι 10 ημέρες.

Το C. m. subsp. sepedonicus αναπτύσσεται αργά, συνήθως παράγοντας αποικίες χρώματος κρεμ, υπερυψωμένες, μεγέθους μύτης καρφίτσας εντός δέκα ημερών. (Φωτογραφίες τυπικών αποικιών του C. m. subsp. sepedonicus, βλέπε ιστοχώρο: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

8.2.2. Επαναδιασπείρονται γραμμωτά για να εξασφαλιστεί η καθαρότητα.

Οι ρυθμοί ανάπτυξης βελτιώνονται με υποκαλλιέργειες. Οι τυπικές αποικίες είναι χρώματος κρεμ-λευκού ή ελεφαντίνου, ενδεχομένως κίτρινου, στρογγυλές, λείες, υπερυψωμένες, θολωτές, βλεννώδεις-ρευστές, με πλήρη περίμετρο και με διάμετρο 1-3 mm συνήθως.

Μια απλή χρώση κατά Gram (προσάρτημα 9) μπορεί να συμβάλει στην επιλογή των αποικιών για τη διενέργεια περαιτέρω δοκιμών.

8.2.3. Ταυτοποιούνται οι πιθανές καλλιέργειες (βλέπε ενότητα 9) και πραγματοποιείται δοκιμή παθογένειας (βλέπε ενότητα 10).

9. Ταυτοποίηση

Ταυτοποιούνται οι καθαρές καλλιέργειες των πιθανών απομονώσεων του C. m. subsp. sepedonicus χρησιμοποιώντας τουλάχιστον δύο από τις ακόλουθες δοκιμές που βασίζονται σε διαφορετικές βιολογικές αρχές.

Για κάθε δοκιμή που πραγματοποιείται, συμπεριλαμβάνονται γνωστά στελέχη αναφοράς όπου ενδείκνυται.

9.1. Θρεπτικές και ενζυματικές δοκιμές ταυτοποίησης

Προσδιορίζονται οι ακόλουθες φαινοτυπικές ιδιότητες που παρουσιάζει ή όχι εν γένει το C. m. subsp. sepedonicus, σύμφωνα με τις μεθόδους των Lelliott και Stead (1987), Klement et al. (1990), Schaad (2001), Anonymous (1987).

Όλα τα υποστρώματα πρέπει να επωάζονται στους 21 °C και να εξετάζονται ύστερα από έξι ημέρες. Εάν το βακτήριο δεν έχει αναπτυχθεί, η επώαση συνεχίζεται για 20 ημέρες συνολικά.

Όλες οι δοκιμές πρέπει να περιλαμβάνουν ένα γνωστό στέλεχος του C. m. subsp. sepedonicus ως μάρτυρα. Οι θρεπτικές και φυσιολογικές δοκιμές πρέπει να διενεργούνται με τη χρήση μολυσμάτων από υποκαλλιέργειες σε nutrient agar. Οι μορφολογικές συγκρίσεις πρέπει να γίνονται από καλλιέργειες σε nutrient dextrose agar.

Δοκιμές	Αναμενόμενο αποτέλεσμα
Δοκιμή οξείδωσης/ζύμωσης (O/F)	Αδρανές ή ασθενώς οξειδωτικό
Ενεργότητα οξειδάσης	-
Ανάπτυξη στους 37 °C	-
Ενεργότητα ουρεάσης	-
Υδρόλυση αισκουλίνης	+
Υδρόλυση αμύλου	- ή ασθενής
Ανοχή σε 7 % NaCl	-
Παραγωγή ινδόλης	-
Δραστηριότητα καταλάσης	+
Παραγωγή H2S	-
Χρησιμοποίηση κιτρικών ιόντων	-
Υγροποίηση ζελατίνης	-
Παραγωγή οξέος από γλυκερίνη	-
Παραγωγή οξέος από λακτόζη	- ή ασθενής
Παραγωγή οξέος από ραμνόζη	-
Παραγωγή οξέος από σαλικίνη	-
Χρώση κατά Gram (Προσάρτημα 9)	+



9.2. Δοκιμή IF

α) Παρασκευάζεται αιώρημα περίπου 106 κυττάρων ανά ml σε ρυθμιστικό διάλυμα IF (Προσάρτημα 3).

β) Παρασκευάζεται σειρά διπλών αραιώσεων κατάλληλου αντιορρού.

γ) Εφαρμόζουμε τη διαδικασία IF (ενότητα 4).

δ) Επιτυγχάνεται θετική δοκιμή IF εάν ο τίτλος IF της καλλιέργειας είναι ισοδύναμος με αυτόν του θετικού μάρτυρα.

9.3. Δοκιμή PCR

α) Παρασκευάζεται αιώρημα περίπου 106 κυττάρων ανά ml σε υπέρ καθαρό νερό (UPW).

β) Θερμαίνονται 100 μl του αιωρήματος κυττάρων σε κλειστούς σωλήνες σε θερμικό μπλοκ ή αναβράζον υδατόλουτρο στους 100 °C για 4 λεπτά. Εάν είναι απαραίτητο, η προσθήκη NaOH που έχει μόλις παρασκευασθεί σε τελική συγκέντρωση 0,05M είναι δυνατόν να συμβάλει στη λύση των κυττάρων. Τα δείγματα μπορούν τότε να αποθηκευθούν σε θερμοκρασία -16 έως -24 °C έως ότου χρειασθεί να χρησιμοποιηθούν.

γ) Εφαρμόζονται οι κατάλληλες διαδικασίες PCR για να ενισχυθούν τα ειδικά αμπλικόνια του C. m. subsp. sepedonicus (π.χ. Pastrik, 2000· βλέπε προσάρτημα 4· Li και de Boer, 1995 Mills et al., 1997· Pastrik και Rainey, 1999· Mills et al., 1999)·

δ) Επιτυγχάνεται θετική ταυτοποίηση του C. m. subsp. sepedonicus εάν τα αμπλικόνια της PCR έχουν το ίδιο μέγεθος και τους ίδιους πολυμορφισμούς μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού όπως το στέλεχος των θετικών μαρτύρων.

9.4. Δοκιμή FISH

α) Παρασκευάζεται αιώρημα περίπου 10^6 κυττάρων ανά ml σε UPW.

β) Εφαρμόζουμε τη διαδικασία FISH (ενότητα 5).

γ) Επιτυγχάνεται θετική δοκιμή FISH εάν επιτυγχάνονται οι ίδιες αντιδράσεις από την καλλιέργεια και το θετικό μάρτυρα.

9.5. Προφίλ σε λιπαρά οξέα (FAP)

α) Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε trypticase soy agar (Oxoid) για 72 ώρες στους 21°C (+/-1°).

β) Εφαρμόζεται κατάλληλη διαδικασία FAP (Janse, 1991· Stead, 1992).

γ) Επιτυγχάνεται θετική δοκιμή FAP εάν το προφίλ της πιθανής καλλιέργειας είναι το ίδιο με αυτό του θετικού μάρτυρα. Η παρουσία χαρακτηριστικών λιπαρών οξέων είναι 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 και 17:0. Το Anteiso είναι σε μεγάλο βαθμό ενδεικτικό του C. m. ssp sepedonicus. Άλλα γένη όπως το Curtobacterium, το Arthrobacter και το Micrococcus έχουν επίσης ορισμένα από τα οξέα αυτά αλλά το 15:1 Anteiso A είναι σπάνιο οξύ στα εν λόγω βακτήρια ενώ παρουσιάζεται σε όλα τα Clavibacter spp. και σε ποσοστό 1-5%. Στο C. m. ssp sepedonicus η τιμή είναι συνήθως γύρω στο 5%.

9.6. BOX-PCR

α) Παρασκευάζεται αιώρημα περίπου 106 κυττάρων ανά ml σε UPW.

β) Η δοκιμή εφαρμόζεται σύμφωνα με τη διαδικασία (Smith et al., 2001).

10. ΔΟΚΙΜΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ

Η δοκιμή παθογένειας πρέπει να πραγματοποιείται ως τελική επιβεβαίωση της διάγνωσης του C. m. subsp. sepedonicus καθώς και για την εκτίμηση της παθογένειας των καλλιεργειών που ταυτοποιούνται ως C. m. subsp. sepedonicus:

10.1. Παρασκευάζεται ένα μόλυσμα περίπου 10^6 κυττάρων ανά ml από καλλιέργειες 3 ημερών της απομόνωσης προς δοκιμή καθώς και κατάλληλο στέλεχος θετικού μάρτυρα του C. m. subsp. sepedonicus.

10.2. Μολύνονται 5-10 στελέχη νεαρών σποροφύτων μελιτζάνας στο στάδιο του 3 πραγματικού φύλλου (ενότητα 7.3 ή 7.4).

10.3. Επωάζονται σε 18-24 ^{0}C με επαρκές φως και υψηλή σχετική υγρασία με κατάλληλο πότισμα έτσι ώστε να αποφευχθεί η υπεράρδευση ή η καταπόνηση από ξηρασία (ενότητα 7.7). Στις καθαρές καλλιέργειες, ο τυπικός μαρασμός επέρχεται εντός 2 εβδομάδων αλλά τα φυτά που δεν εμφανίζουν συμπτώματα (βλέπε ενότητα 7.8) μετά την παρέλευση του χρονικού διαστήματος αυτού πρέπει να επωάζονται έως 3 εβδομάδες σε θερμοκρασίες που ευνοούν την ανάπτυξη των φυτών μελιτζάνας αλλά δεν υπερβαίνουν τους 25 ^{0}C (Προσάρτημα 8). Εάν δεν εμφανιστούν συμπτώματα εντός 3 εβδομάδων, η καλλιέργεια δεν μπορεί να επαληθευθεί ως παθογόνος μορφή του C. m. subsp. sepedonicus.

10.4. Πραγματοποιείται απομόνωση από φυτά που παρουσιάζουν συμπτώματα με αφαίρεση τμήματος του στελέχους 2 cm πάνω από το σημείο μόλυνσης. Τεμαχίζουμε τους ιστούς και παρασκευάζουμε αιώρημα σε ένα μικρό όγκο αποστειρωμένου, αποσταγμένου νερού ή σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (Προσάρτημα 3). Απομονώνουμε από το αιώρημα με εξάπλωση αραιώσεων ή γραμμική εξάπλωση σε MTNA και YPGA (Προσάρτημα 5), επωάζουμε για 3-5 ημέρες στους 21-23 ^{0}C και παρατηρούμε το σχηματισμό τυπικών αποικιών του C. m. subsp. sepedonicus

Προσάρτημα 1

Εμπλεκόμενα εργαστήρια στη βελτιστοποίηση και επικύρωση των πρωτοκόλλων

Εργαστήριο(¹)	Θέση	Χώρα
Agentur fór Gesundheit und Ernahrungssicherheit	Βιέννη και Linz	Αυστρία
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Βέλγιο
Plantedirektoratet	Lyngby	Δανία
Central Science Laboratory	York	Αγγλία
Scottish Agricultural Science Agency	Εδιμβούργο	Σκωτία
Laboratoire National de la Protection des Vegetaux, Unite de Bacteriologie	Angers	Γαλλία
Laboratoire National de la Protection des Vegetaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Γαλλία
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Γερμανία
Pflanzenschutzamt Hannover	Ανόβερο	Γερμανία
State Laboratory	Δουβλίνο	Ιρλανδία
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Κάτω Χώρες
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Νορβηγία
Direcηγo-Geral de Protecηγo das Culturas	Λισσαβώνα	Πορτογαλία
Nacionalni institut za biologijo	Λουμπλιάνα	Σλοβενία
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Ισπανία

(¹) Στοιχεία επιστημόνων: βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

Προσάρτημα 2

Παρασκευή θετικών και αρνητικών μαρτύρων για τις βασικές δοκιμές διαλογής PCR/IF και FISH

Παράγεται καλλιέργεια 72 ωρών παθογόνου στελέχους του C. m. subsp. sepedonicus [NCPPB 4053 ή PD 406] σε βασικό υπόστρωμα MTNA και παρασκευάζεται αιώρημα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM έτσι ώστε να επιτευχθεί πυκνότητα κυττάρων περίπου 1 έως 2x108 cfu ανά ml. Αυτό επιτυγχάνεται συνήθως με ελαφρώς θολό αιώρημα ισοδύναμο με οπτική πυκνότητα 0,20 σε 600 nm.

Αφαιρούνται κώνοι από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου 200 κονδύλων που έχουν ληφθεί από την παραγωγή ποικιλίας λευκής επιδερμίδας, η οποία είναι γνωστό ότι είναι απαλλαγμένη από το C. m. subsp. sepedonicus.

Οι κώνοι από τα σημεία πρόσφυσης του στολονίου υποβάλλονται σε κατεργασία όπως συνήθως και το ίζημα αναδιαλύεται σε 10 ml.

Παρασκευάζονται 10 αποστειρωμένα μικροφιαλίδια των 1,5 ml με 900 μl αναδιαλυμένου ιζήματος.

Μεταφέρονται 100 μl αιωρήματος C. m. subsp. sepedonicus στο πρώτο μικροφιαλίδιο. Αναδεύουμε με στροβιλισμό (vortex).

Προσδιορίζονται τα δεκαδικά επίπεδα μόλυνσης με

περαιτέρω αραίωση στα επόμενα πέντε μικροφιαλίδια.

Τα έξι μολυσμένα μικροφιαλίδια θα χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες. Τα τέσσερα μη μολυσμένα μικροφιαλίδια θα χρησιμοποιηθούν ως αρνητικοί μάρτυρες. Τα μικροφιαλίδια μαρκάρονται καταλλήλως.

Παρασκευάζονται ποσότητες 100 μl σε αποστειρωμένα μικροφιαλίδια των 1,5 ml και, κατ' αυτόν τον τρόπο, παράγονται 9 επαναλήψεις κάθε δείγματος μάρτυρα. Αποθηκεύονται στους

-16 έως -24^{0}C έως ότου χρησιμοποιηθούν.

Η παρουσία και ο ποσοτικός προσδιορισμός του C. m. subsp. sepedonicus στα δείγματα μαρτύρων πρέπει να επιβεβαιωθούν πρώτα από τη δοκιμή IF.

Για τη δοκιμή PCR πραγματοποιείται εξαγωγή DNA από δείγματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων με κάθε σειρά δειγμάτων δοκιμής.

Για τις δοκιμές IF και FISH πραγματοποιούνται δοκιμές σε δείγματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων με κάθε σειρά δειγμάτων δοκιμής.

Για τις δοκιμές IF, FISH και PCR, το C. m. subsp. sepedonicus πρέπει να ανιχνευθεί σε τουλάχιστον 106 και 104 κύτταρα/ml των θετικών μαρτύρων και σε κανέναν από τους αρνητικούς μάρτυρες.

Προσάρτημα 3

Ρυθμιστικά διαλύματα για τις διαδικασίες δοκιμής

ΓΕΝΙΚΑ: Τα αποστειρωμένα ρυθμιστικά διαλύματα που δεν έχουν ανοιχθεί μπορούν να αποθηκευθούν έως ένα έτος.

1. Ρυθμιστικά διαλύματα για τη διαδικασία εξαγωγής

1.1. Ρυθμιστικό διάλυμα εξαγωγής (50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7,0)

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του βακτηρίου από ιστούς φυτών με ομοιογενοποίηση ή ανάδευση.

Na_2HPO_4 (άνυδρο)	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Αποσταγμένο νερό	1,00 L

Διαλύονται τα συστατικά, ελέγχεται η τιμή του pH και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 ^{0}C επί 15 λεπτά.

Πρόσθετα συστατικά μπορούν να είναι χρήσιμα ως ακολούθως:

	Σκοπός	Ποσότητα (ανά l)
Lubrol flakes	Αντικροκιδωτικό (*)	0,5 g
DC silicone antifoam	Αντιαφριστικός παράγοντας (*)	1,0 ml
Tetrasodium pyrophosphate	Αντιοξειδωτικό	1,0 g
Polyvinylpyrrolidone-40000 (PVP-40)	Δέσμευση παρεμποδιστών της PCR	50 g

(*) Για χρήση στο πλαίσιο της μεθόδου εξαγωγής με ομοιογενοποίηση

1.2. Ρυθμιστικό διάλυμα ιζήματος (10 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7,2)

Το εν λόγω ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για επανασχηματισμό αιωρήματος και αραίωση εκχυλισμάτων κώνων από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου κονδύλων πατάτας μετά τη συγκέντρωση σε ίζημα μέσω φυγοκέντρισης.

Na_2HPO_4. $12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
Αποσταγμένο νερό	1,00 L

Διαλύονται τα συστατικά, ελέγχεται η τιμή του pH και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 ^{0}C επί 15 λεπτά.

2. Ρυθμιστικά διαλύματα για τη δοκιμή IF

2.1. Ρυθμιστικό διάλυμα IF (10 mM φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος (PBS), pH 7,2)

Το ρυθμιστικό διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την αραίωση των αντισωμάτων.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 L

Διαλύονται τα συστατικά, ελέγχεται η τιμή του pH και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 ^{0}C επί 15 λεπτά.

2.2. Ρυθμιστικό διάλυμα IF-Tween

Αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για την πλύση των αντικειμενοφόρων πλακών.

Προστίθεται 0,1% Tween 20 στο ρυθμιστικό διάλυμα IF.

2.3. Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα γλυκερίνης, pH 7,6

Αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται ως ρευστό έγκλεισης στα φατνία των αντικειμενοφόρων πλακών της IF για την ενίσχυση του φθορισμού.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,15 g
Γλυκερίνη	50 ml
Αποσταγμένο νερό	100 ml

Αντιξεθωριαστικά διαλύματα υλικού έγκλεισης διατίθενται στο εμπόριο π.χ. Vectashield® (Vector Laboratories) ή Citifluor® (Leica).

Προσάρτημα 4

Προσδιορισμός του επιπέδου μόλυνσης στις δοκιμές IF και FISH

1. Μετράται ο μέσος αριθμός των τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά οπτικό πεδίο (c).

2. Υπολογίζεται ο αριθμός των τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά φατνίο αντικειμενοφόρου πλάκας μικροσκοπίου (C).

$$C = c \times S/s$$

όπου S = εμβαδόν του φατνίου μιας πολυφατνιακής αντικειμενοφόρου και

s = εμβαδόν του οπτικού πεδίου του αντικειμενικού

$s = \pi i^2/4G^2K^2$ όπου i = συντελεστής πεδίου (κυμαίνεται

από 8 έως 24 ανάλογα με τον τύπο του προσοφθαλμίου)

K = συντελεστής σωλήνα (1 ή 1,25)

G = μεγεθυντική ισχύς του αντικειμενικού φακού (100x, 40x κ.τ.λ.)

3. Υπολογίζεται ο αριθμός τυπικών φθοριζόντων κυττάρων ανά ml αναδιαλυμένου ιζήματος (N)

N = C x 1000/y x F

όπου y = όγκος του αναδιαλυμένου ιζήματος σε κάθε φατνίο και

F = συντελεστής αραίωσης του αναδιαλυμένου ιζήματος

Προσάρτημα 5

Θρεπτικά υποστρώματα για την απομόνωση και καλλιέργεια του C. m. subsp. sepedonicus

α) Γενικά υποστρώματα ανάπτυξης

Nutrient agar (NA)

Nutrient agar (Difco)	23,0 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 L

Διαλύονται τα συστατικά και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Nutrient dextrose agar (NDA)

Difco bacto nutrient agar που περιέχει 1 % D(+) γλυκόζη (μονοϋδρική). Αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 115 °C επί 20 λεπτά.

Yeast peptone glucose agar (YPGA)

Yeast Extract (Difco)	5,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	5,0 g
D(+)-γλυκόζη (μονοϋδρική)	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 L

Διαλύονται τα συστατικά και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C επί 15 λεπτά.

Υπόστρωμα yeast extract mineral salts (YGM)

Bacto-Yeast-Extract (Difco) 2,0 g

D(+)-γλυκόζη (μονοϋδρική) 2,5g

K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
MgSO4. $7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4$. H2O	0,015 g
NaCl	0,05 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Bacto-Agar (Difco)	18 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 L

Διαλύονται τα συστατικά και το υπόστρωμα αποστειρώνεται σε παρτίδες του 1/2 λίτρου, σε αυτόκαυστο, στους 115°C επί 20 λεπτά.

β) Επικυρωμένα εκλεκτικά υποστρώματα ανάπτυξης

Υπόστρωμα MTNA

Εκτός και αν υπάρχει διαφορετική αναφορά, όλα τα συστατικά υποστρώματος προέρχονται από την BDH

Yeast Extract (Difco)	2,0 g
Μαννιτόλη	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
NaCl	0,05 g
$MgSO_4.7\ H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.H_2O$	0,015 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Agar (Oxoid αριθμ. 1)	16,0 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 L

Διαλύονται τα συστατικά, το pH ρυθμίζεται στο 7.2. Μετά την αποστείρωση σε αυτόκαυστο (στους 121 °C για 15 λεπτά) και την ψύξη στους 50 °C, προστίθενται τα αντιβιωτικά: trimethoprim 0,06 g, nalidixic acid 0,002 g, amphotericin B 0,01 g.

Πυκνά διαλύματα αντιβιωτικών: trimethoprim (Sigma) και nalidixic acid (Sigma) (και τα δύο σε 5 mg/ml), σε 96% μεθανόλη, amphotericin B (Sigma) (1 mg/ml) σε dimethyl sulfoxide. Τα πυκνά διαλύματα αποστειρώνονται με διήθηση μέσω φίλτρου.

Σημείωση:

Η διατηρησιμότητα του βασικού θρεπτικού υλικού είναι 3 μήνες. Μετά την προσθήκη των αντιβιοτικών, η διατηρησιμότητα είναι 1 μήνα εάν το υλικό αποθηκεύεται στο ψυγείο.

Υπόστρωμα NCP-88

Nutrient agar (Difco)	23 g
Yeast Extract (Difco)	2 g
D-μαννιτόλη	5 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	0,5 g
$MgSO_4.7\ H_2O$	0,25 g
Αποσταγμένο νερό	1,0 L

Διαλύονται τα συστατικά, το pH ρυθμίζεται στο 7.2. Μετά την αποστείρωση σε αυτόκαυστο και την ψύξη στους 50 °C, προστίθενται τα ακόλουθα αντιβιοτικά: Polymyxin B sulphate (Sigma) 0,003g, nalidixic acid (Sigma) 0,008 g, Cycloheximide (Sigma) 0,2 g.

Τα αντιβιοτικά διαλύονται σε πυκνά διαλύματα ως εξής: το nalidixic acid σε 0,01 M NaOH, το cycloheximide σε 50% αιθανόλης, το polymyxin B sulphate σε αποσταγμένο νερό. Τα πυκνά διαλύματα αποστειρώνονται με διήθηση μέσω φίλτρου.

Σημείωση:

Η διατηρησιμότητα του βασικού θρεπτικού υλικού είναι 3 μήνες. Μετά την προσθήκη των αντιβιοτικών, το υλικό είναι διατηρήσιμο για 1 μήνα εάν αποθηκεύεται στο ψυγείο.

Προσάρτημα 6

Επικυρωμένα πρωτόκολλα και αντιδραστήρια PCR

Σημείωση:

Οι προκαταρκτικές δοκιμές πρέπει επιτρέπουν την αναπαραγώγιμη ανίχνευση τουλάχιστον 103 έως 104 κυττάρων του C. m. ssp. sepedonicus ανά ml εκχυλίσματος δείγματος.

Οι προκαταρκτικές δοκιμές πρέπει επίσης να μην δείχνουν οιαδήποτε λανθασμένα θετικά αποτελέσματα με ένα σύνολο επιλεγμένων στελεχών βακτηρίων.

1. Πρωτόκολλο πολλαπλής PCR με εσωτερικό μάρτυρα PCR (Pastrik, 2000)

1.1. Εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων

Πρόσθιος εκκινητής PSA-1	5΄- ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3΄
Αντίστροφος εκκινητής PSA -R	5΄- tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3΄
Πρόσθιος εκκινητής NS-7-F	5΄- gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3΄
Αντίστροφος εκκινητής NS-8-R	5΄- tcc gca ggt tca cct acg ga -3΄

Αναμενόμενο μέγεθος του αμπλικονίου από το DNA αναφοράς του C. m. subsp. sepedonicus = 502 bp (σετ εκκινητών PSA).

Αναμενόμενο μέγεθος αμπλικονίου από εσωτερικό μάρτυρα της PCR 18S rRNA = 377 bp (σετ εκκινητών NS).

1.2. Μείγμα αντίδρασης PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο UPW	15,725 μl	
10x ρυθμιστικό διάλυμα PCR(1) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 μl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (κλάσμα V) (10%)	0,25 μl	0,1%
Μείγμα d-NTP (20mM)	0,125 μl	0,1 mM
Εκκινητής PSA-1 (10μM)	0,5 μl	0,2 μM
Εκκινητής PSA-R (10μM)	0,5 μl	0,2 μM
Εκκινητής NS-7-F (10μM) (2)	0,1 μl	0,04 μM
Εκκινητής NS-8-R (10μM) (2)	0,1 μl	0,04 μM
Taq πολυμεράση (5U/μl) (1)	0,2 μl	1,0 U
Όγκος δείγματος	5,0 μl	
Συνολικός όγκος:	25,0 μl	

(1) Οι μέθοδοι επικυρώθηκαν χρησιμοποιώντας *Taq* πολυμεράση των Perkin Elmer (AmpliTaq ή Gold) και Gibco BRL.

(2) Η συγκέντρωση των εκκινητών NS-7 F και NS-8-R βελτιστοποιήθηκε για το εκχύλισμα κώνου από το σημείο πρόσφυσης του στολονίου πατάτας χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ομοιογενοποίησης και τον καθαρισμό DNA σύμφωνα με τον Pastrik (2000) [βλέπε ενότητα 6.1.α) και 6.2]. Η επαναβελτιστοποίηση των συγκεντρώσεων αντιδραστηρίων θα απαιτηθεί εάν χρησιμοποιηθεί η εξαγωγή με ανάδευση ή άλλη μέθοδο απομόνωσης του DNA.

1.3. Συνθήκες αντίδρασης PCR

Ακολουθείται το εξής πρόγραμμα:

1 κύκλος από:	i) 3 λεπτά στους 95 °C (μετουσίωση του πρότυπου DNA)
10 κύκλοι από:	ii) 1 λεπτό στους 95 °C (μετουσίωση του πρότυπου DNA)
	iii) 1 λεπτό στους 64 °C (προσκόλληση εκκινητών)
	iv) 1 λεπτό στους 72 °C (επέκταση αντιγράφου)
25 κύκλοι σε:	v) 30 δευτερόλεπτα στους 95 °C (μετουσίωση του αρχικού DNA)
	vi) 30 δευτερόλεπτα στους 62 °C (προσκόλληση εκκινητών)
	vii) 1 λεπτό στους 72 °C (επέκταση αντιγράφου)
1 κύκλος από:	viii) 5 λεπτά στους 72 °C (τελική επέκταση)
	ix) διατήρηση στους 4 °C.

Σημείωση:

Το πρόγραμμα αυτό βελτιστοποιείται για χρήση με θερμικό κυκλοποιητή MJ Research PTC 200. Ενδέχεται να απαιτηθεί τροποποίηση της διάρκειας των βημάτων των κύκλων ii), iii) iv), v), vi) και vii) για χρήση με άλλα μοντέλα.

1.4. Ανάλυση του αμπλικονίου με ένζυμο περιορισμού.

Τα προϊόντα PCR που έχουν ενισχυθεί από το DNA του C. m. subsp. sepedonicus παράγουν έναν χαρακτηριστικό πολυμορφισμό μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού με το ένζυμο Bgl II μετά από επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά. Τα θραύσματα εκ περιορισμού που αποκτώνται από το ειδικό για το C. m. subsp. sepedonicus θραύσμα έχουν μέγεθος 282 bp και 220 bp.

2. Παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης

2.1. Bromophenol blue (10%-μητρικό διάλυμα)

Bromophenol blue	5 g
Αποσταγμένο νερό (διπλά αποσταγμένο)	50 ml

2.2. Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης

Γλυκερίνη (86%)	3,5 ml
Bromophenol blue (5.1)	300 μl
Αποσταγμένο νερό (διπλά αποσταγμένο)	6,2 ml

3. 10X Tris Acetate EDTA (TAE) ρυθμιστικό διάλυμα, pH 8.0

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris	48,4 g
Κρυσταλλικό οξικό οξύ	11,42 ml
EDTA (disodium salt)	3,72 g
Αποσταγμένο νερό	1,00 L

Διαλύεται σε 1x πριν τη χρήση.

Διατίθεται επίσης στο εμπόριο (π.χ. Invitrogen ή ισοδύναμο).

Προσάρτημα 7

Επικυρωμένα αντιδραστήρια για τη δοκιμή FISH

1. Ολιγοανιχνευτές

Εξειδικευμένος ανιχνευτής για το Cms CMS-CY3-01: 5΄- TTG CGG GGC GCA CAT CTC TGC ACG -3΄

Μη εξειδικευμένος ανιχνευτής ευβακτηρίου EUB-338-FITC: 5΄- GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3΄

2. Προσηλωτικό διάλυμα

[ΠΡΟΣΟΧΗ! ΤΟ ΠΡΟΣΗΛΩΤΙΚΟ ΥΓΡΟ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΠΑΡΑΦΟΡΜΑΛΔΕΫΔΗ Η ΟΠΟΙΑ ΕΙΝΑΙ ΤΟΞΙΚΗ. ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΦΟΡΟΥΝΤΑΙ ΓΑΝΤΙΑ ΚΑΙ ΝΑ ΜΗΝ ΓΙΝΟΝΤΑΙ ΕΙΣΠΝΟΕΣ. ΣΥΝΙΣΤΑΤΑΙ Η ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΕ ΑΠΑΓΩΓΟ]

i) Θερμαίνονται 9 ml ύδατος μοριακού βαθμού καθαρότητας [π.χ. υπέρ καθαρό νερό (UPW)] σε περίπου 60 ^{0}C και προστίθενται 0,4 g παραφορμαλδεΰδης. Η παραφορμαλδεΰδη διαλύεται μετά την προσθήκη 5 σταγόνων 1N NaOH και αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα.

ii) Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 7.0 με την προσθήκη 1ml 0,1 M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PB· pH 7.0) και 5 σταγόνων 1N HCl. Ελέγχεται το pH με ταινίες δεικτών και προσαρμόζεται εάν είναι απαραίτητο με HCl ή NaOH.

[ΠΡΟΣΟΧΗ! ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΠΕΧΑΜΕΤΡΟ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΜΕ ΠΑΡΑΦΟΡΜΑΛΔΕΫΔΗ]

iii) Το διάλυμα φιλτράρεται μέσω φίλτρου μεμβράνης 0,22 μm και διατηρείται απαλλαγμένο από σκόνη στους 4 ^{0}C έως ότου ξαναχρησιμοποιηθεί.

iv) Σημείωση:

Εναλλακτικό προσηλωτικό διάλυμα: 96% αιθανόλη.

3. 3x Hybmix

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7.4)
EDTA (αποστειρωμένο με διήθηση από φίλτρο και σε αυτόκαυστο)	15 mM

Αραιώνεται 1x, όπως απαιτείται.

4. Διάλυμα υβριδισμού

1x Hybmix	
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	0,01%
ανιχνευτής EUB 338	5 ng/μl
ανιχνευτής CMSCY301	5 ng/μl

Παρασκευάζονται ποσότητες διαλύματος υβριδισμού σύμφωνα με τους υπολογισμούς του πίνακα. Για κάθε αντικειμενοφόρο (που περιλαμβάνει 2 διαφορετικά δείγματα εις διπλούν) απαιτούνται 90 μl διαλύματος υβριδισμού.

Πίνακας: Συνιστώμενες ποσότητες για την παρασκευή του μείγματος υβριδισμού.

	2 αντικειμενοφόρες πλάκες	8 αντικειμενοφόρες πλάκες
Αποστειρωμένο UPW	50,1	200,4
3x hybmix	30,0	120,0
1% SDS	0,9	3,6
Ανιχνευτής EUB 338 (100 ng/μl)	4,5	18,0
Ανιχνευτής CMSCY301 (100 ng/μl)	4,5	18,0
Συνολικός όγκος (μl)	90,0	360,0

Σημείωση: Όλα τα διαλύματα που περιλαμβάνουν ολιγοανιχνευτές ευαίσθητους στο φως αποθηκεύονται στο σκοτάδι στους -20 ^{0}C. Προστατεύονται από το άμεσο φως του ηλίου ή το ηλεκτρικό φως κατά τη χρήση.

5. 0,1M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.0

Na_2HPO_4	8,52 g
KH_2PO_4	5,44 g
Αποσταγμένο νερό	1,00 L

Διαλύονται τα συστατικά, ελέγχεται η τιμή του pH και το υλικό αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 ^{0}C επί 15 λεπτά.

Προσάρτημα 8

Καλλιέργεια φυτών μελιτζάνας

Σπόροι μελιτζάνας (Solanum melongena) σπέρνονται σε παστεριωμένο υπόστρωμα. Μετά την πλήρη έκπτυξη των κοτυληδόνων (10-14 ημέρες), τα σπορόφυτα μεταφυτεύονται σε γλάστρες με παστεριωμένο υπόστρωμα.

Τα φυτά μελιτζάνας πρέπει να καλλιεργούνται σε θερμοκήπιο με τις ακόλουθες συνθήκες περιβάλλοντος:

Μήκος ημέρας: 14 ώρες ή φυσικό μήκος ημέρας, αν είναι μεγαλύτερο.

Θερμοκρασία: ημέρα: 21 έως 24 ^{0}C,
νύχτα: 15 ^{0}C.

Ευπαθείς ποικιλίες φυτών μελιτζάνας:
«Black Beauty»,
«Long Tom»,
«Rima»,
«Balsas»

Προμηθευτής: βλέπε ιστοχώρο http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

Προσάρτημα 9

Διαδικασία χρώσης κατά Gram

(τροποποίηση του Hucker) (Doetsch, 1981) (1)

Διάλυμα crystal violet

Διαλύονται 2 g crystal violet σε 20 ml αιθανόλης 95 %.

Διαλύονται 0,8 g οξαλικού αμμωνίου σε 80 ml αποσταγμένου νερού.

Αναμειγνύονται τα δύο διαλύματα.

Ιώδιο του Lugol

Ιώδιο	1 g
Ιωδιούχο κάλιο	2 g
Αποσταγμένο νερό	300 ml

Τα στερεά κονιοποιούνται σε ιγδίο. Προστίθενται στο νερό και αναδεύονται εντός κλειστού δοχείου μέχρις ότου διαλυθούν.

Διάλυμα επίχρωσης σαφρανίνης

Αποθεματικό διάλυμα:

Σαφρανίνη O	2,5 g
95 % αιθανόλη	100 ml

Αναμειγνύονται και αποθηκεύονται.

Αραιώνεται: 1:10 για την απόκτηση του διαλύματος εργασίας.

(1) Είναι επίσης δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διαλύματα καθώς και μέσα χρώσης (staining kits) που διατίθενται στο εμπόριο.

Διαδικασία χρώσης

1. Το δείγμα εξαπλούται ως λεπτό φιλμ στην αντικειμενοφόρο, ξηραίνεται στον αέρα και προσηλώνεται με θερμότητα.

2. Η αντικειμενοφόρος καλύπτεται πλήρως, επί 1 λεπτό, με διάλυμα crystal violet.

3. Η αντικειμενοφόρος πλένεται σύντομα με νερό της βρύσης.

4. Η αντικειμενοφόρος καλύπτεται πλήρως με ιώδιο του Lugol επί 1 λεπτό.

5. Η αντικειμενοφόρος πλένεται με νερό της βρύσης και στεγνώνεται με διηθητικό χαρτί.

6. Η αντικειμενοφόρος πλάκα αποχρωματίζεται με 95% αιθανόλη που προστίθεται στάγδην μέχρι να παύσει η αφαίρεση χρώματος ή η αντικειμενοφόρος εμβαπτίζεται, με ελαφρή ανάδευση, σε αιθανόλη 95 % επί 30 δευτερόλεπτα.

7. Η αντικειμενοφόρος πλένεται με νερό της βρύσης και στεγνώνεται με διηθητικό χαρτί.

8. Η αντικειμενοφόρος καλύπτεται πλήρως με διάλυμα σαφρανίνης επί 10 δευτερόλεπτα.

9. Η αντικειμενοφόρος πλένεται με νερό της βρύσης και στεγνώνεται με διηθητικό χαρτί.

Τα θετικά κατά Gram βακτήρια εμφανίζουν ιώδη-κυανό χρωματισμό. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια εμφανίζουν ρόδινο-ερυθρό χρωματισμό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium Corynebacterium sepedonicum in batches of potato tubers. Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, Λουξεμβούργο. Publ EUR 11288 EN, 21 σ.

2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213-218.

3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of Corynebacterium sepedonicum from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147-152.

4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.

5. Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24-26.

6. Janse, J. D., 1991. Infra- and intra-specific classification of Pseudomonas solanacearum strains using whole cell fatty acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14˙ 335-345.

7. Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh, 1987. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (Corynebacterium sepedonicum) in potato. EPPO Bull.,17, 1987, pp. 1-10.

8. Jansing, H. and K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Diseases and Protection, 105, 590-601.

9. Kovacs, N., 1956. Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.

10. Klement Z.˙ Rudolph, K.and D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadımiai Kiadσ, Budapest, 568 σ.

11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114-118.

12. Lelliott, R. A., E. Billing and A.C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470-489.

13. Lelliott, R. A., and P. W. Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (Corynebacterium sepedonicum (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 (2), 101-106.

14. Li, X. and S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus. Phytopathology, 85, 837-842.

15. Mills, D., Russell, B., W. and J., W. Hanus, 1997. Specific detection of Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology, 87, (8), 853-861.

16. Pastrik, K. -H. and R.A. Rainey, 1999. Identification and differentiation of Clavibacter michiganensis subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147, 687-693.

17. Pastrik, K.-H., 2000. Detection of Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 106, 155-165.

18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 σ.

19. Schaad, W., Y. Berthier-Schaad, , A. Sechler, and D. Knorr, 1999. Detection of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83,· 1095-1100.

20. Schaad, W., 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.· St. Paul, Minnesota:, 373 σ.

21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.

22. Smith, N. C. J. Hennessy, and D.E., Stead, 2001. Repetetive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1Ralstonia solanacearum primer for rapid identification of plant pathogen Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus. European Journal of Plant Pathology, 107 (7), 739-748.

23. Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of Pseudomonas working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481-527.

24. Stead, D.E., 1992. Grouping of plant pathogenic and some other Pseudomonas spp. using cellular fatty acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42,· 281-295.

25. Wullings, B. A.., Van Beuningen, A.R.˙J.D., Janse, and A. D. L. Akkermans, 1998. Detection of Ralstonia solanacearum, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4546-4554.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

1. Για κάθε ύποπτη παρουσία για την οποία υπάρχει θετικό αποτέλεσμα στη(-ις) δοκιμή(-ές) διαλογής σύμφωνα με τις μεθόδους που ορίζονται στο Παράρτημα Ι και για την οποία αναμένεται επιβεβαίωση ή διάψευση με την ολοκλήρωση των εν λόγω μεθόδων, παρακρατούνται και φυλάσσονται κατάλληλα:

- όλοι οι κόνδυλοι του δείγματος και, όταν είναι εφικτό, όλα τα φυτά της δειγματοληψίας,
- κάθε εναπομένον εκχύλισμα και πρόσθετο υλικό που παρασκευάσθηκε για την ή τις δοκιμές διαλογής π.χ. αντικειμενοφόροι πλάκες ανοσοφθορισμού,

και

- όλη η σχετική τεκμηρίωση, μέχρι την ολοκλήρωση των εν λόγω μεθόδων.

Η παρακράτηση των κονδύλων θα επιτρέψει τη διενέργεια δοκιμής ποικιλιών όπου ενδείκνυται.

2. Σε περίπτωση θετικής επιβεβαίωσης του οργανισμού, παρακρατείται και φυλάσσεται καταλλήλως:

- το υλικό που αναφέρεται στην παράγραφο 1

και

- ένα δείγμα του προσβεβλημένου υλικού μελιτζάνας το οποίο έχει μολυνθεί τεχνητά με εκχύλισμα κονδύλου ή φυτού

και

- η απομονωμένη καλλιέργεια του οργανισμού,

για τουλάχιστον ένα μήνα μετά τη διαδικασία κοινοποίησης βάσει του άρθρου 5, παράγραφος 2.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III

1. Τα στοιχεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τον προσδιορισμό της έκτασης της πιθανής μόλυνσης βάσει του άρθρου 5, παράγραφος 1, στοιχείο β) της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης, περιλαμβάνουν:

- κονδύλους ή φυτά που παράγονται σε περιοχή παραγωγής χαρακτηρισμένη ως μολυσμένη βάσει του άρθρου 5, παράγραφος 1, στοιχείο α) της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης,

- περιοχή(-ές) παραγωγής που συνδέονται παραγωγικά με τους κονδύλους ή τα φυτά που έχουν χαρακτηρισθεί ως μολυσμένα βάσει του άρθρου 5, παράγραφος 1, στοιχείο α) της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που χρησιμοποιούν τον ίδιο εξοπλισμό και εγκαταστάσεις παραγωγής απευθείας ή μέσω κοινού αναδόχου,

- κονδύλους ή φυτά που παράγονται στην ή τις περιοχές παραγωγής που αναφέρονται στην προηγούμενη περίπτωση ή που υπήρχαν σ' αυτή την περιοχή ή περιοχές παραγωγής κατά την περίοδο κατά την οποία οι κόνδυλοι ή τα φυτά που χαρακτηρίζονται ως μολυσμένα βάσει του άρθρου 5, παράγραφος 1, στοιχείο α) της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης υπήρχαν στις περιοχές παραγωγής που αναφέρονται στην πρώτη περίπτωση,

- κτιριακές εγκαταστάσεις όπου χειρίζονται οι πατάτες από τις περιοχές παραγωγής που αναφέρονται στις παραπάνω περιπτώσεις,

- κάθε μηχάνημα, όχημα, πλοίο, αποθήκη ή μονάδα αυτών και κάθε άλλο αντικείμενο, συμπεριλαμβανομένων των υλικών συσκευασίας, που ενδέχεται να έχουν έλθει σε επαφή με κονδύλους ή φυτά χαρακτηρισμένα ως μολυσμένα βάσει του άρθρου 5, παράγραφος 1, στοιχείο α) της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης,

- κάθε κόνδυλο ή φυτό που έχει αποθηκευθεί ή έχει έλθει σε επαφή, με οποιαδήποτε κατασκευή ή αντικείμενο που απαριθμείται στην προηγούμενη περίπτωση, πριν από τον καθαρισμό ή την απολύμανση αυτών των κατασκευών και αντικειμένων,

- ως αποτέλεσμα των δοκιμών που αναφέρονται στο άρθρο 6 της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης, εκείνους τους κονδύλους ή τα φυτά με αδελφική ή γονική κλωνική σχέση με τους κονδύλους ή τα φυτά που χαρακτηρίστηκαν μολυσμένα βάσει του άρθρου 5, παράγραφος 1, στοιχείο α) της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης, και για τους οποίους μολονότι ενδέχεται να έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα κατά τις δοκιμές ανίχνευσης του οργανισμού, κρίνεται ότι η μόλυνση είναι πιθανή μέσω κλωνικής σχέσης. Η δοκιμή ποικιλιών μπορεί να διεξαχθεί για την επαλήθευση της ταυτότητας των μολυσμένων και κλωνικά σχετιζομένων κονδύλων ή φυτών και

- τον ή τους τόπους παραγωγής των κονδύλων ή φυτών που αναφέρονται στην προηγούμενη περίπτωση.

2. Τα στοιχεία που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τον προσδιορισμό της πιθανολογούμενης μετάδοσης που αναφέρεται στο άρθρο 5, παράγραφος 1, στοιχείο γ) της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης, πρέπει να περιλαμβάνουν:

- τη γειτνίαση άλλων περιοχών παραγωγής όπου καλλιεργούνται πατάτες ή άλλα φυτά ξενιστές,

- την κοινή παραγωγή και χρήση αποθεμάτων πατατόσπορου,

3. Η κοινοποίηση που αναφέρεται στο άρθρο 5, παράγραφος 2, πρώτο εδάφιο της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης πρέπει να παρέχεται ως ακολούθως:

- αμέσως μετά την επιβεβαίωση της παρουσίας του οργανισμού από τις εργαστηριακές δοκιμές, κάνοντας χρήση των μεθόδων που παρατίθενται στο Παράρτημα I, τουλάχιστον:

- την ονομασία της ποικιλίας της παρτίδας πατάτας,

- τον τύπο [πατάτες (ware potatoes), πατατόσπορος κ.τ.λ.] και, όπου είναι εφαρμόσιμο, την κατηγορία του πατατόσπορου,

- στις περιπτώσεις που υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης της πατάτας στη Χώρα από άλλο κράτος μέλος εφ΄ όσον έχει επιβεβαιωθεί η μόλυνση, η Διεύθυνση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων διαβιβάζει αμέσως στο ενδιαφερόμενο κράτος μέλος τις πληροφορίες που είναι αναγκαίες προκειμένου να συμμορφωθεί με το άρθρο 5, παράγραφος 3 της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης, όπως:

- την ονομασία της ποικιλίας της παρτίδας πατάτας

- την ονομασία και τη διεύθυνση του αποστολέα και του παραλήπτη,

- την ημερομηνία παραλαβής της παρτίδας πατάτας,

- το μέγεθος της παρτίδας πατάτας που παραλήφθηκε,

- αντίγραφο του φυτοϋγειονομικού διαβατηρίου ή τουλάχιστον τον αριθμό του φυτοϋγειονομικού διαβατηρίου όπου χρειάζεται ή τον αριθμό μητρώου του καλλιεργητή ή εμπόρου όπου χρειάζεται και αντίγραφο της ειδοποίησης παράδοσης.

Η Επιτροπή πρέπει να ενημερώνεται αμέσως όταν έχει παρασχεθεί τέτοια πληροφόρηση:

- μετά την ολοκλήρωση όλων των ερευνών, για κάθε περίπτωση:

- την ημερομηνία που επιβεβαιώθηκε η μόλυνση,

- σύντομη περιγραφή της έρευνας που έλαβε χώρα για την ταυτοποίηση της πηγής και την ενδεχόμενη επέκταση της μόλυνσης, συμπεριλαμβανομένου του επιπέδου της δειγματοληψίας που πραγματοποιήθηκε,

- πληροφορίες σχετικά με την(-ις) ταυτοποιημένη(-ες) ή πιθανή(-ές) πηγή(-ές) μόλυνσης,

- λεπτομέρειες σχετικά με την έκταση της προσδιορισθείσας μόλυνσης, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού χώρων παραγωγής και του αριθμού παρτίδων με ένδειξη της ποικιλίας και, στην περίπτωση πατατόσπορου, της κατηγορίας,

- λεπτομέρειες της οριοθέτησης ζώνης, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των περιοχών παραγωγής, που δεν έχουν χαρακτηρισθεί ως μολυσμένες, αλλά συμπεριλαμβάνονται στη ζώνη,

- οποιαδήποτε άλλη πληροφορία σχετική με το επιβεβαιωθέν(-ντα) κρούσμα(-τα), την οποία απαιτεί η Επιτροπή.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

1. Τα επισήμως εποπτευόμενα μέτρα που αναφέρονται στο άρθρο 7, παράγραφος 1 της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης, πρέπει να είναι:

- χρήση ως ζωοτροφή μετά από θερμική επεξεργασία ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος επιβίωσης του οργανισμού

ή

- διάθεση σε επισήμως εγκεκριμένη τοποθεσία διάθεσης αποβλήτων, στην οποία δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος διαφυγής του παθογόνου στο περιβάλλον, π.χ. μέσω διήθησηςσε γεωργικά εδάφη

ή

- καύση

ή

- βιομηχανική μεταποίηση με απευθείας και άμεση παράδοση σε μεταποιητική μονάδα με επίσημα εγκεκριμένες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων για τις οποίες έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού και με σύστημα καθαρισμού και απολύμανσης τουλάχιστον των αναχωρούντων οχημάτων

ή

- άλλα μέτρα, με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού· τα μέτρα αυτά και η αιτιολόγησή τους κοινοποιούνται αμέσως από τη Διεύθυνση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων στην Επιτροπή και τα άλλα κράτη μέλη.

Όλα τα εναπομείναντα απόβλητα που σχετίζονται και προκύπτουν από τα ανωτέρω διατίθενται με επισήμως εγκεκριμένες μεθόδους σύμφωνα με το παράρτημα V της παρούσας απόφασης.

2. Η κατάλληλη χρήση ή διάθεση κονδύλων ή φυτών που έχουν προσδιορισθεί ως πιθανώς μολυσμένα σύμφωνα με το άρθρο 5, παράγραφος 1, στοιχείο β) της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης, και αναφέρονται στο άρθρο 7, παράγραφος 2 της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης, υπό τον έλεγχο των αρμόδιων αρχών, με την κατάλληλη επικοινωνία μεταξύ τους ώστε να εξασφαλίζεται πάντοτε ο έλεγχος αυτός και με την έγκρισή τους στην περίπτωση που οι πατάτες συσκευάζονται ή μεταποιούνται όσον αφορά τις εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων που αναφέρονται στην πρώτη και τη δεύτερη περίπτωση, πρέπει να είναι:

- χρήση ως πατάτες (ware potatoes) προοριζόμενες για κατανάλωση, συσκευασμένες για άμεση παράδοση και χρήση χωρίς επανασυσκευασία, σε χώρο με κατάλληλες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων. Πατάτες που προορίζονται για φύτευση μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία στον ίδιο χώρο, μόνον εάν η επεξεργασία αυτή γίνει χωριστά ή μετά από καθαρισμό και απολύμανση,

ή

- χρήση ως πατάτες (ware potatoes) προοριζόμενες για βιομηχανική μεταποίηση και οι οποίες προορίζονται για απευθείας και άμεση παράδοση σε μεταποιητική μονάδα με κατάλληλες εγκαταστάσεις διάθεσης αποβλήτων και με σύστημα καθαρισμού και απολύμανσης τουλάχιστον των αναχωρούντων οχημάτων,

ή

- άλλη χρήση ή διάθεση, με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος διάδοσης του οργανισμού και υπό την προϋπόθεση της έγκρισης από τις αρμόδιες αρχές.

3. Οι κατάλληλες μέθοδοι καθαρισμού και απολύμανσης των αντικειμένων που αναφέρονται στο άρθρο 7, παράγραφος 3 της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης πρέπει να είναι αυτές για τις οποίες έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος διάδοσης του οργανισμού και εφαρμόζονται υπό την εποπτεία των αρμοδίων αρχών.

4. Η σειρά μέτρων που εφαρμόζουν οι αρμόδες αρχές μέσα στην οριοθετημένη ζώνη που διαπιστώθηκε βάσει του άρθρου 5, παράγραφος 1, στοιχείο γ της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης και αναφέρεται στο άρθρο 7, παράγραφος 4 της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης, περιλαμβάνει:

4.1. σε τόπους παραγωγής που χαρακτηρίζονται ως μολυσμένοι βάσει του άρθρου 5, παράγραφος 1, στοιχείο α) της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης:

α) σε αγρό που χαρακτηρίζεται ως μολυσμένος βάσει του άρθρου 5, παράγραφος 1, στοιχείο α) της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης, είτε

i) - κατά τη διάρκεια των τριών τουλάχιστον καλλιεργητικών ετών μετά το έτος της προσδιορισθείσας μόλυνσης,

- λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και άλλων αυτοφυών φυτών που είναι ξενιστές του οργανισμού

και

- δεν φυτεύονται κόνδυλοι πατάτας, φυτά ή πραγματικοί σπόροι ή άλλα αυτοφυή φυτά που είναι ξενιστές του οργανισμού, ή φυτά για τα οποία υπάρχει εμφανής κίνδυνος διάδοσης του οργανισμού,

- κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση και υπό τον όρο ότι ο αγρός έχει βρεθεί απαλλαγμένος από αυτοφυή φυτά πατάτας και άλλα αυτοφυή φυτά που είναι ξενιστές του οργανισμού, κατά τη διάρκεια επίσημων επιθεωρήσεων για τα δύο τουλάχιστον συνεχή καλλιεργητικά έτη πριν τη φύτευση, επιτρέπεται μόνον η παραγωγή πατατών (ware potatoes) και οι συγκομιζόμενοι κόνδυλοι πρέπει να ελέγχονται σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται λεπτομερώς στο Παράρτημα I,

- κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση και σύμφωνα με ένα κατάλληλο σύστημα αμειψισποράς, που πρέπει να είναι τουλάχιστον δύο έτη εάν πρόκειται να καλλιεργηθεί πατατόσπορος, μπορεί να φυτεύονται πατάτες είτε για παραγωγή πατατόσπορου είτε για παραγωγή πατάτας (ware potatoes) και πραγματοποιείται επίσημη επισκόπηση (survey) όπως καθορίζεται στο άρθρο 2, παράγραφος 1 της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης ή

ii) - κατά τη διάρκεια των τεσσάρων καλλιεργητικών ετών μετά την περίοδο της προσδιορισθείσας μόλυνσης,

- λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας και άλλων αυτοφυών φυτών που είναι ξενιστές του οργανισμού

και

- ο αγρός διατηρείται είτε χέρσος είτε ως μόνιμος βοσκότοπος στον οποίο, η βλάστηση κόβεται συχνά και χαμηλά ή χρησιμοποιείται για εντατική βόσκηση,

- κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο πατάτας μετά την περίοδο που καθορίζεται στην προηγούμενη περίπτωση και υπό τον όρο ότι ο αγρός έχει βρεθεί απαλλαγμένος από αυτοφυή φυτά πατάτας και άλλα αυτοφυή φυτά που είναι ξενιστές του οργανισμού κατά τη διάρκεια επίσημων επιθεωρήσεων για τα δύο τουλάχιστον συνεχή καλλιεργητικά έτη πριν τη φύτευση, επιτρέπεται η παραγωγή πατατόσπορου ή πατάτας και οι συγκομιζόμενοι κόνδυλοι ελέγχονται σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται λεπτομερώς στο Παράρτημα Ι·

β) σε όλους τους άλλους αγρούς του μολυσμένου τόπου παραγωγής και εφόσον οι οικείες αρμόδες αρχές κρίνουν ότι έχει εξαλειφθεί ο κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού από αυτοφυή φυτά πατάτας και άλλα αυτοφυή φυτά που βρέθηκαν να είναι ξενιστές του οργανισμού:

- το καλλιεργητικό έτος μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση είτε δεν φυτεύονται κόνδυλοι, φυτά ή πραγματικοί σπόροι πατάτας ή άλλα αυτοφυή φυτά που βρέθηκαν να είναι ξενιστές του οργανισμού ή

- μπορεί να φυτευθεί πιστοποιημένος πατατόσπορος μόνον για παραγωγή πατάτας (ware potatoes),

- στο δεύτερο καλλιεργητικό έτος που ακολουθεί αυτού κατά το οποίο προσδιορίστηκε η μόλυνση, φυτεύεται μόνον πιστοποιημένος πατατόσπορος ή πατατόσπορος που έχει υποβληθεί σε επίσημο έλεγχο για την απουσία της δακτυλιωτής σήψης και έχει καλλιεργηθεί υπό επίσημο έλεγχο σε διαφορετικούς τόπους παραγωγής από αυτούς που αναφέρονται στο σημείο 4.1, για παραγωγή πατατόσπορου ή πατάτας (ware potatoes),

- για τουλάχιστον το τρίτο καλλιεργητικό έτος μετά την περίοδο της προσδιορισθείσας μόλυνσης, μόνον πιστοποιημένος πατατόσπορος ή πατατόσπορος που καλλιεργείται υπό επίσημο έλεγχο από πιστοποιημένο πατατόσπορο φυτεύεται για παραγωγή πατατόσπορου ή πατάτας (ware potatoes),

- σε κάθε καλλιεργητικό έτος που αναφέρεται στις προηγούμενες περιπτώσεις, λαμβάνονται μέτρα για την εξάλειψη των αυτοφυών φυτών πατάτας ή άλλων αυτοφυών φυτών που βρέθηκαν να είναι ξενιστές του οργανισμού, εάν υπάρχουν και σε κάθε αγροτεμάχιο καλλιέργειας πατάτας διενεργείται επίσημος έλεγχος των συγκομισθέντων πατατών σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο Παράρτημα Ι,

γ) αμέσως μετά τον χαρακτηρισμό μόλυνσης σύμφωνα με το άρθρο 5, παράγραφος 1, στοιχείο α) της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης και μετά το πρώτο καλλιεργητικό έτος που ακολουθεί, όλα τα μηχανήματα και οι αποθηκευτικοί χώροι στον τόπο παραγωγής που έχουν σχέση με την παραγωγή πατάτας, καθαρίζονται και απολυμαίνονται κατάλληλα με τις κατάλληλες μεθόδους όπως ορίζεται στο σημείο 3·

δ) σε μία μονάδα προστατευόμενης φυτικής παραγωγής όπου είναι δυνατή η πλήρης αντικατάσταση του υποστρώματος ανάπτυξης,

- δεν φυτεύονται κόνδυλοι, φυτά ή πραγματικοί σπόροι παρά μόνον εάν στη μονάδα παραγωγής εφαρμόζονται επισήμως εποπτευόμενα μέτρα για την εξάλειψη του οργανισμού και την απομάκρυνση όλου του υλικού των φυτών ξενιστών, συμπεριλαμβανομένης, τουλάχιστον, μιας πλήρους αντικατάστασης του υποστρώματος βλάστησης και καθαρισμού και απολύμανσης της μονάδας παραγωγής και όλου του εξοπλισμού, και, στη συνέχεια έχει χορηγηθεί άδεια για παραγωγή πατάτας από τις αρμόδες αρχές˙

και

- η παραγωγή πατάτας γίνεται από πιστοποιημένο πατατόσπορο ή από μικροκονδύλους (mini-tubers) ή μικροφυτά (micro-plants) που προέρχονται από ελεγχθείσες πηγές·

4.2. εντός της οριοθετημένης ζώνης, με την επιφύλαξη των μέτρων που περιγράφονται στο σημείο 4.1, οι αρμόδες αρχές, με ελέγχους που διενεργούν:

α) αμέσως μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση, εξασφαλίζουν ότι όλα τα μηχανήματα και οι αποθηκευτικοί χώροι σε τέτοιες εγκαταστάσεις που συνδέονται με την παραγωγή πατάτας καθαρίζονται και απολυμαίνονται κατάλληλα, με τις ενδεδειγμένες μεθόδους, όπως ορίζεται στο σημείο 3·

β) αμέσως, και για τρεις τουλάχιστον καλλιεργητικές περιόδους μετά την προσδιορισθείσα μόλυνση:

- εξασφαλίζουν την εποπτεία των χώρων που καλλιεργούνται, αποθηκεύονται ή διακινούνται κόνδυλοι πατάτας, καθώς και των χώρων στους οποίους λειτουργούν, βάσει σύμβασης, μηχανήματα για τις πατάτες,

- απαιτούν να φυτεύεται αποκλειστικά πιστοποιημένος πατατόσπορος ή πατατόσπορος που έχει παραχθεί υπό επίσημο έλεγχο για όλες τις καλλιέργειες πατάτας που βρίσκονται στη ζώνη αυτή, και δοκιμή (εργαστηριακός έλεγχος), μετά τη συγκομιδή, του πατατόσπορου που παράγεται σε τόπους παραγωγής που έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανώς μολυσμένοι, σύμφωνα με το άρθρο 5, παράγραφος 1, στοιχείο β) της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης,

- απαιτούν τη χωριστή διαχείριση αποθεμάτων συγκομισθέντος πατατόσπορου και εκείνων της πατάτας (ware potatoes) για όλες τις εγκαταστάσεις που βρίσκονται εντός της ζώνης ή ένα σύστημα καθαρισμού και απολύμανσης που θα πρέπει να εφαρμόζεται μεταξύ της διαχείρισης των αποθεμάτων πατατόσπορου και πατάτας (ware potatoes),

- διενεργούν επίσημη επισκόπηση (survey) όπως περιγράφεται στο άρθρο 2, παράγραφος 1 της υπ' αριθμ. 399882/1994 (Β΄ 743) κοινής υπουργικής απόφασης·

γ) καταρτίζουν, κατά περίπτωση, πρόγραμμα αντικατάστασης όλων των αποθεμάτων πατατόσπορου σε εύθετο χρονικό διάστημα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

Οι επίσημα εγκεκριμένες μέθοδοι διάθεσης αποβλήτων που αναφέρονται στο Παράρτημα IV, Παράγραφος 1, είναι σύμφωνες με τις ακόλουθες διατάξεις έτσι ώστε να αποτραπεί οιοσδήποτε εμφανής κίνδυνος διάδοσης του οργανισμού:

i) απόβλητα πατάτας (συμπεριλαμβανομένων των απορριφθέντων πατατών και του φλοιού πατάτας) και οποιοδήποτε άλλο στερεό απόβλητο που συνδέεται με τις πατάτες (συμπεριλαμβανομένου του χώματος, των πετρών και άλλων υπολειμμάτων) πρέπει να απομακρύνονται είτε με,

- διάθεση σε επισήμως εγκεκριμένο και ειδικό χώρο

διάθεσης αποβλήτων όπου δεν υφίσταται εμφανής κίνδυνος διάδοσης του οργανισμού στο περιβάλλον, π.χ. μέσω της διήθησης σε γεωργική γη. Τα απόβλητα μεταφέρονται απευθείας στον εν λόγω χώρο υπό συνθήκες περιορισμού, έτσι ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος απώλειας των αποβλήτων,

ή

- καύση,

ή

- άλλα μέτρα, με την προϋπόθεση ότι έχει διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει εμφανής κίνδυνος μετάδοσης του οργανισμού· τα μέτρα αυτά κοινοποιούνται από τη Διεύθυνση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων στην Επιτροπή και τα άλλα κράτη μέλη.

ii) υγρά απόβλητα: πριν από τη διάθεσή τους, τα υγρά απόβλητα που περιέχουν αιωρούμενα στερεά στοιχεία υποβάλλονται σε διαδικασίες διήθησης ή καθίζησης για την απομάκρυνση των στερεών αυτών στοιχείων. Η διάθεση των στερεών αυτών στοιχείων γίνεται με τους τρόπους που προβλέπονται στο σημείο i).

Τα υγρά απόβλητα πρέπει είτε:

- να θερμαίνονται κατ΄ ελάχιστον στους 60°C σε όλο τον όγκο τουλάχιστον για 30 λεπτά πριν από τη διάθεσή τους,

ή

- να διατίθενται με άλλο τρόπο που έχει εγκριθεί επισήμως και υπό επίσημο έλεγχο, ώστε να μην υπάρχει εμφανής κίνδυνος επαφής των αποβλήτων με γεωργική γη. Οι λεπτομέρειες των μέτρων αυτών κοινοποιούνται από τη Διεύθυνση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων στα άλλα κράτη μέλη και στην Επιτροπή.

Οι επιλογές που παρατίθενται στο παρόν Παράρτημα ισχύουν επίσης για τα απόβλητα που έχουν σχέση με τη διαχείριση, διάθεση και επεξεργασία μολυσμένων παρτίδων.»

Άρθρο 3

Μετά το άρθρο 12 της υπ' αριθμ. 399882/1994 κοινής υπουργικής απόφασης προστίθεται άρθρο 13, το οποίο έχει ως εξής:

«Άρθρο 13
Εξουσιοδότηση

Με απόφαση του Υπουργού Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων που δημοσιεύεται στην Εφημερίδα της Κυβερνήσεως δύναται, μετά από εισήγηση της Διεύθυνσης Προστασίας Φυτικής Παραγωγής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, να ρυθμίζονται ειδικά και τεχνικά θέματα και κάθε άλλη λεπτομέρεια για την εφαρμογή της παρούσας απόφασης. Με όμοια απόφαση δύναται να τροποποιούνται τα παραρτήματα, σε συμμόρφωση προς τις κοινοτικές οδηγίες που τροποποιούν τα εν λόγω παραρτήματα.»

Άρθρο 4
(Άρθρο 2 Οδηγία 2006/56/ΕΚ)

Η παρούσα απόφαση ισχύει από την 1η Απριλίου 2007.

Η απόφαση αυτή να δημοσιευθεί στην Εφημερίδα της Κυβερνήσεως.

Αθήνα, 15 Μαρτίου 2007

ΟΙ ΥΠΟΥΡΓΟΙ

ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΩΝ	ΥΦΥΠ. ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
Γ. ΑΛΟΓΟΣΚΟΥΦΗΣ	**Α. ΚΟΝΤΟΣ**

ΕΘΝΙΚΟ ΤΥΠΟΓΡΑΦΕΙΟ

ΕΦΗΜΕΡΙΔΑ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ

ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΑ ΓΡΑΦΕΙΑ ΠΩΛΗΣΗΣ Φ.Ε.Κ.

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ - Βασ. Όλγας 227 **23104 23956**
ΠΕΙΡΑΙΑΣ - Ευριπίδου 63 **210 4135228**
ΠΑΤΡΑ - Κορίνθου 327 **2610 638109**
ΙΩΑΝΝΙΝΑ - Διοικητήριο **26510 87215**
ΚΟΜΟΤΗΝΗ - Δημοκρατίας 1 **25310 22858**
ΛΑΡΙΣΑ - Διοικητήριο **2410 597449**
ΚΕΡΚΥΡΑ - Σαμαρά 13 **26610 89122**
ΗΡΑΚΛΕΙΟ - Πεδιάδος 2 **2810 300781**
ΜΥΤΙΛΗΝΗ - Πλ. Κωνσταντινουπόλεως 1 **22510 46654**

ΤΙΜΗ ΠΩΛΗΣΗΣ ΦΥΛΛΩΝ ΕΦΗΜΕΡΙΔΟΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ

Σε έντυπη μορφή

- Για τα Φ.Ε.Κ. από 1 μέχρι 16 σελίδες σε 1 €, προσαυξανόμενη κατά 0,20 € για κάθε επιπλέον οκτασέλιδο ή μέρος αυτού.
- Για τα φωτοαντίγραφα Φ.Ε.Κ. σε 0,15 € ανά σελίδα.

Σε μορφή DVD/CD

Τεύχος	Ετήσια έκδοση	Τριμηνιαία έκδοση	Μηνιαία έκδοση
Α΄	150 €	40 €	15 €
Β΄	300 €	80 €	30 €
Γ΄	50 €	-	-
Υ.Ο.Δ.Δ.	50 €	-	-
Δ΄	110 €	30 €	-

Τεύχος	Ετήσια έκδοση	Τριμηνιαία έκδοση	Μηνιαία έκδοση
Α.Α.Π.	110 €	30 €	-
Ε.Β.Ι.	100 €	-	-
Α.Ε.Δ.	5 €	-	-
Δ.Δ.Σ.	200 €	-	20 €
Α.Ε. - Ε.Π.Ε. και **Γ.Ε.ΜΗ.**	-	-	100 €

- Η τιμή πώλησης μεμονωμένων Φ.Ε.Κ. σε μορφή cd-rom από εκείνα που διατίθενται σε ψηφιακή μορφή και μέχρι 100 σελίδες, σε 5 € προσαυξανόμενη κατά 1 € ανά 50 σελίδες.
- Η τιμή πώλησης σε μορφή cd-rom/dvd, δημοσιευμάτων μιας εταιρείας στο τεύχος Α.Ε.-Ε.Π.Ε. και Γ.Ε.ΜΗ. σε 5 € ανά έτος.

ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΟΛΗ Φ.Ε.Κ.: Τηλεφωνικά: 210 4071010 - fax: 210 4071010 - internet: http://www.et.gr

ΕΤΗΣΙΕΣ ΣΥΝΔΡΟΜΕΣ Φ.Ε.Κ.

Τεύχος	Έντυπη μορφή	Ψηφιακή Μορφή
Α΄	225 €	190 €
Β΄	320 €	225 €
Γ΄	65 €	Δωρεάν
Υ.Ο.Δ.Δ.	65 €	Δωρεάν
Δ΄	160 €	80 €
Α.Α.Π.	160 €	80 €
Ε.Β.Ι.	65 €	33 €

Τεύχος	Έντυπη μορφή	Ψηφιακή Μορφή
Α.Ε.Δ.	10 €	Δωρεάν
Α.Ε. - Ε.Π.Ε. και **Γ.Ε.ΜΗ.**	2.250 €	645 €
Δ.Δ.Σ.	225 €	95 €
Α.Σ.Ε.Π.	70€	Δωρεάν
Ο.Π.Κ.	-	Δωρεάν
Α΄+ Β΄+ Δ΄ + Α.Α.Π.	-	450 €

- Το τεύχος Α.Σ.Ε.Π. (έντυπη μορφή) θα αποστέλλεται σε συνδρομητές ταχυδρομικά, με την επιβάρυνση των 70 €, ποσό το οποίο αφορά τα ταχυδρομικά έξοδα.
- Για την παροχή πρόσβασης μέσω διαδικτύου σε Φ.Ε.Κ. προηγουμένων ετών και συγκεκριμένα στα τεύχη: **α)** Α, Β, Δ, Α.Α.Π., Ε.Β.Ι. και Δ.Δ.Σ., η τιμή προσαυξάνεται, πέραν του ποσού της ετήσιας συνδρομής του 2007, κατά 40 € ανά έτος και ανά τεύχος και **β)** για το τεύχος Α.Ε.-Ε.Π.Ε. & Γ.Ε.ΜΗ., κατά 60 € ανά έτος παλαιότητας.

* Η καταβολή γίνεται σε όλες τις Δημόσιες Οικονομικές Υπηρεσίες (Δ.Ο.Υ.). Το πρωτότυπο διπλότυπο (έγγραφο αριθμ. πρωτ. 9067/28.2.2005 2η Υπηρεσία Επιτρόπου Ελεγκτικού Συνεδρίου) με φροντίδα των ενδιαφερομένων, πρέπει να αποστέλλεται ή να κατατίθεται στο Εθνικό Τυπογραφείο (Καποδιστρίου 34, Τ.Κ. 104 32 Αθήνα).

* Σημειώνεται ότι φωτοαντίγραφα διπλοτύπων, ταχυδρομικές Επιταγές για την εξόφληση της συνδρομής, δεν γίνονται δεκτά και θα επιστρέφονται.

* Οι οργανισμοί τοπικής αυτοδιοίκησης, τα νομικά πρόσωπα δημοσίου δικαίου, τα μέλη της Ένωσης Ιδιοκτητών Ημερησίου Τύπου Αθηνών και Επαρχίας, οι τηλεοπτικοί και ραδιοφωνικοί σταθμοί, η Ε.Σ.Η.Ε.Α., τα τριτοβάθμια συνδικαλιστικά Όργανα και οι τριτοβάθμιες επαγγελματικές ενώσεις δικαιούνται έκπτωσης πενήντα τοις εκατό (50%) επί της ετήσιας συνδρομής (τρέχον έτος + παλαιότητα).

* Το ποσό υπέρ Τ.Α.Π.Ε.Τ. [5% επί του ποσού συνδρομής (τρέχον έτος + παλαιότητα)], καταβάλλεται ολόκληρο (Κ.Α.Ε. 3512) και υπολογίζεται πριν την έκπτωση.

* Στην Ταχυδρομική συνδρομή του τεύχους Α.Σ.Ε.Π. δεν γίνεται έκπτωση.

Πληροφορίες για δημοσιεύματα που καταχωρούνται στα Φ.Ε.Κ. στο τηλ.: 210 5279000.
Φωτοαντίγραφα παλαιών Φ.Ε.Κ.: Μάρνη 8 τηλ.: 210 8220885, 210 8222924, 210 5279050.
Οι πολίτες έχουν τη δυνατότητα ελεύθερης ανάγνωσης των δημοσιευμάτων που καταχωρούνται σε όλα τα τεύχη της Εφημερίδας της Κυβερνήσεως πλην εκείνων που καταχωρούνται στο τεύχος Α.Ε.-Ε.Π.Ε και Γ.Ε.ΜΗ., από την ιστοσελίδα του Εθνικού Τυπογραφείου (www.et.gr).

Οι υπηρεσίες εξυπηρέτησης πολιτών λειτουργούν καθημερινά από 08:00 μέχρι 13:00



ΑΠΟ ΤΟ ΕΘΝΙΚΟ ΤΥΠΟΓΡΑΦΕΙΟ
ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΟΥ 34 * ΑΘΗΝΑ 104 32 * ΤΗΛ. 210 52 79 000 * FAX 210 52 21 004
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: http://www.et.gr – e-mail: webmaster@et.gr